

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estructura y función del complejo multienzimático ácido
graso sintetasa de ceratitis capitata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Antonio Ramos Atance

Madrid, 2015

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTRUCTURA Y FUNCION DEL COMPLEJO MULTIENTENZIMATICO
ACIDO GRASO SINTETASA DE CERATITIS CAPITATA

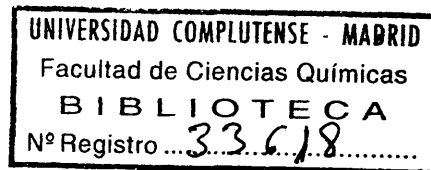
MEMORIA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas

presenta

JOSE ANTONIO RAMOS ATANCE

b25265192
i37874172



Madrid, 1975

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid, bajo la dirección de D. Angel Martín Municio, a quien deseo expresar mi agradecimiento por su valiosa ayuda.

Mientras no sepamos si nuestro trabajo va a tener algún valor para la sociedad en la que vivimos.

Mientras no aprendamos que incluso el bedel y la señora de la limpieza pueden enseñarnos algo.

Mientras no sepamos rechazar toda aquella investigación que se nos imponga y que creamos que va a ser inútil.

Mientras creamos que todo lo que nos enseña una persona por muy docta y sabia que sea es verdad.

Mientras pensemos que podemos trabajar en una rama de la ciencia aislados por completo del resto de los conocimientos que constituyen la cultura de la Humanidad.

Estaremos JUGANDO a hacer ciencia pero nunca podremos decir que somos científicos.

INDICE

INDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	17
1.1.1. Distribución de ácidos grasos en insectos	19
1.1.2. Biosíntesis de ácidos grasos en insectos	19
1.1.3. Distribución de ácidos grasos en Ceratitis capitata	22
1.1.4. Biosíntesis de ácidos grasos en Ceratitis capitata	23
1.1.5. Biosíntesis de ácidos grasos en fracción mitocondrial del insecto	25
1.2.1. Organización molecular de la Aci- do Graso Sintetasa	26
1.2.2. Proteína transportadora de grupos acilos	33
1.2.3. Acido Graso Sintetasa fácilmente disociable	37
1.2.3.1. Acetil CoA-ACP-transaci- lasa	37
1.2.3.2. Malonil CoA-ACP-transaci- lasa	38
1.2.3.3. β -cetoacil-ACP-sintetasa	38
1.2.3.4. β -cetoacil-ACP-reductasa	39
1.2.3.5. β -hidroxiacil-ACP-dehidrasa	39

	<u>Página</u>
1.2.3.6. Enoil-ACP-reductasa	40
1.2.3.7. Palmitil-ACP-tioesterasa	41
1.2.4. Complejos multienzimáticos	41
1.2.4.1. Transacilaciones	42
1.2.4.2. Reacción de condensación	43
1.2.4.3. Primera reducción, deshi- dratación y segunda reduc- ción	44
1.2.4.4. Terminación de cadena ...	46
1.2.4.5. Disociación y reasocia- ción del complejo	46
1.2.4.6. Etapa limitante de la ve- locidad de síntesis de ácidos grasos	50
1.2.4.7. Control de la actividad del complejo Acido Graso Sintetasa	52
1.3. Especies en que ha sido identificada la Acido Graso Sintetasa	56
1.3.1. Acido Graso Sintetasa de vegetales	56
1.3.2. Acido Graso Sintetasa de bacterias	57
1.3.3. Acido Graso Sintetasa de hongos y levaduras	59
1.3.4. Acido Graso Sintetasa de fitoflage- lados	60
1.3.5. Acido Graso Sintetasa de aves	62
1.3.6. Acido Graso Sintetasa de mamíferos	62
1.3.7. Acido Graso Sintetasa de peces ...	66

	<u>Página</u>
1.3.8. Acido Graso Sintetasa de insectos	66
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Cultivo del insecto	69
2.2. Valoración de actividades enzimáticas en preparado enzimático total del insecto a lo largo de su desarrollo	70
2.2.1. Preparación de homogeneizados to- tales	70
2.2.2. Valoración de Acetil-CoA Carboxi- lasa	71
2.2.3. Valoración de ácidos grasos tota- les	71
2.3. Aislamiento y purificación de la Acido Graso Sintetasa	72
2.3.1. Homogeneización del material bio- lógico	72
2.3.2. Obtención de la fracción soluble	73
2.3.3. Tratamiento con sulfato amónico .	73
2.3.4. Diálisis y tratamiento con sulfa- to de protamina	74
2.3.5. Tratamiento con gel de fosfato cálcico	75
2.3.6. Purificación por cromatografía so- bre DEAE-celulosa	76
2.3.7. Purificación por cromatografía so- bre columna de Sephadex G-150 ...	77
2.4. Métodos de concentración de proteínas ..	78
2.4.1. Concentración en polivinil pirro- lidona	78

	<u>Página</u>
2.4.2. Concentración con Sephadex	78
2.4.3. Concentración en lyphogel	79
2.4.4. Concentración en ultrafiltrador b/ /HFV-1	79
2.4.5. Concentración con células de ultra filtración Amicon	79
2.5. Fraccionamiento subcelular	80
2.5.1. Valoración del sistema de elonga- ción de ácidos grasos en mitocon- drias	83
2.6. Valoración de proteínas	84
2.6.1. Método de Lowry	84
2.6.2. Método del biuret	85
2.6.3. Método de Warburg y Christian	86
2.6.4. Valoración de proteínas por medida de absorción a 215-225 nm	87
2.7. Valoración de actividad enzimática	87
2.7.1. Método espectrofotométrico	87
2.7.2. Método radioactivo	88
2.7.3.1. Extracción de ácidos gra- sos - Método de Bligh-Dyer	89
2.7.3.2. Extracción de ácidos gra- sos - Método de extracción con hexano	90
2.7.4. Medida de la radioactividad incorpo- rada a los ácidos grasos	90
2.8. Control del grado de purificación de la en- zima	91

	<u>Página</u>
2.8.1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida	91
2.8.1.2. Métodos de revelado	93
2.9. Determinación de las propiedades bioquímicas-físicas de la enzima	95
2.9.1. Determinación del peso molecular	95
2.9.1.1. Por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	95
2.9.1.2. Cromatografía en Sephadex G-200	97
2.9.2. Composición de aminoácidos de la proteína	98
2.9.2.1. Análisis de aminoácidos	98
2.9.2.2. Valoración de triptófano	100
2.9.3. Propiedades bioquímicas de la enzima	100
2.9.3.1. FMN	100
2.9.3.2. Identificación de 4'-fopanteteína	101
2.9.3.3. Valoración de grupos SH	101
2.10. Terminalización de cadena	102
2.10.1. Incorporación de Acetil-CoA- ¹⁴ C a ácidos grasos	102
2.10.2. Preparación de los ésteres metílicos	103
2.10.3. Radiocromatografía de gases. Análisis de los ácidos grasos individuales	104
2.10.4. Valoración de acil-CoA	105

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Experiencias preliminares	109
3.1.1. Actividad de la Acetil-CoA Carbo- xilasa y biosíntesis total de áci- dos grasos a lo largo del desarro- llo	109
3.1.2. Estudios sobre la naturaleza adap- tativa de la Acido Graso Sintetasa en larva	110
3.2. Valoración de la Acido Graso Sintetasa .	112
3.2.1. Presencia de cofactores en el me- dio de incubación	112
3.2.2. Tiempo de incubación	113
3.2.3. Concentración de proteínas	114
3.2.4. Fuerza iónica del medio de incuba- ción	115
3.2.5. Influencia del pH de incubación .	115
3.3. Localización subcelular de la biosínte- sis de ácidos grasos en distintos momen- tos del desarrollo	116
3.4. Aislamiento y purificación de la Acido Graso Sintetasa de larva de 6 días	119
3.4.1. Obtención de fracción soluble ...	119
3.4.2. Precipitación con sulfato amónico	121
3.4.2.1. Condiciones de la preci- pitación	121
3.4.2.2. Incidencia del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre el pH control	123

	<u>Página</u>
3.4.2.3. Condiciones de redisolu- ción del precipitado ...	123
3.4.3.1. Tratamiento con gel de fosfato cálcico	125
3.4.3.2. Relación gel/proteína ..	125
3.4.4. Diálisis, tratamiento con sulfato de protamina	127
3.4.4.1. Diálisis	127
3.4.4.2. Precipitación con sulfa to de protamina	128
3.4.4.3. Valoración de ácidos nu- cléicos	129
3.4.5. Tratamiento con DEAE-celulosa ...	129
3.4.6. Paso por columnas de Sephadex G-150	134
3.4.7. Esquema actual de aislamiento y purificación	135
3.5. Conservación de la enzima en las distin- tas etapas de su purificación	136
3.5.1. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	136
3.5.2. Liofilización de la proteína	137
3.5.3. Conservación después del trata- miento con DEAE-celulosa	138
3.5.4. Conservación después del trata- miento con DEAE-celulosa de pro- teína concentrada con diaflo	140
3.6. Métodos de concentración de la disolu- ción de proteína	140

	<u>Página</u>
3.7. Comprobación de la purificación a lo largo del proceso de aislamiento	141
3.8. Propiedades de la Acido Graso Sintetasa	142
3.8.1. Determinación del peso molecular	142
3.8.1.1. Determinación de pesos moleculares en Sephadex G-200	142
3.8.1.2. Determinación de pesos moleculares por electroforesis en presencia de SDS	147
3.8.2. Composición de aminoácidos	152
3.8.2.1. Análisis de aminoácidos	152
3.8.2.2. Valoración de triptófano	153
3.8.2.3. Composición final en aminoácidos de la proteína	155
3.8.3. Requerimientos de la acción enzimática	156
3.8.3.1. pH óptimo de actuación de la enzima	156
3.8.3.2. Influencia de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática	156
3.8.3.3. Influencia de la fuerza iónica del medio	157
3.8.4. Conservación de la enzima	158
3.8.5. Tiempo de incubación	159
3.8.6. Requerimiento de nucleótidos de la enzima (NADH, NADPH, FMN)	161

	<u>Página</u>
3.8.6.1. Influencia de los niveles de NADH sobre la actividad enzimática	161
3.8.6.2. Influencia de los niveles de NADPH sobre la actividad enzimática	162
3.8.6.3. Actuación conjunta NADH-NADPH	163
3.8.6.4. Actuación conjunta NADH-FMN y NADPH-FMN	164
3.8.6.5. Presencia de FMN	166
3.8.7. Cinética de Michaelis	166
3.8.7.1. Acetil CoA	166
3.8.7.2. Malonil CoA	167
3.8.7.3. NADPH	168
3.8.8. Presencia de 4'-fosfopanteteína ..	169
3.8.9. Valoración de grupos SH	170
3.8.10. Ácidos grasos producidos por el complejo multienzimático	171
4. CONCLUSIONES	175
5. BIBLIOGRAFIA	183
6. FIGURAS	197

1. INTRODUCCION

1.1.1. DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN INSECTOS

La composición en ácidos grasos de los insectos (115, 116, 181) con algunas excepciones es análoga a la de otros organismos superiores y muy semejante a la de animales terrestres.

En el momento presente se conoce la composición de una amplia variedad de insectos pertenecientes a los siete órdenes Lepidóptera, Hemíptera, Orthóptera, Díptera, Hymenóptera y Dictyóptera.

El gran número de especies de insectos existentes hace muy difícil el poder dar un esquema de dicha composición, pero puede indicarse que los ácidos grasos que aparecen en mayor proporción son palmítico y esteárico, siendo la presencia del primero generalmente bastante superior a la del segundo.

Los ácidos grasos monoinsaturados aparecen en mayor cantidad que los poliinsaturados siendo de destacar la gran proporción de 18:1 en coleópteros y lepidópteros, la de 16:1 en dípteros que pueden variar entre un 19 y un 60% y la de monoinsaturados menores de 14:0 en hemípteros.

Otras excepciones a esta composición general serían las encontradas en los hemípteros Aphidos (117) donde los ácidos grasos 14:0 constituyen el 82% y Coccidos (118) en los que los ácidos grasos de cadena más larga de 14:0 constituyen solo un 20%, siendo 10:0 y 12:0 los dos ácidos grasos más abundantes.

1.1.2. BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN INSECTOS

La biosíntesis de ácidos grasos ha sido estudiada tanto "in vivo" como "in vitro" en varias especies de insectos.

tos.

De los experimentos realizados "in vitro" se pueden destacar los resultados obtenidos con homogeneizados del lepidóptero *Prodenia eridiana* (119) y del ortóptero *Locusta migratoria* (120), centrifugados a 20,000 x g y del díptero *Aldrichina grahami* (121) centrifugados a 100,000 x g, los cuales sintetizan ácidos grasos a partir de acetato. El requerimiento de cofactores tales como ATP, CoA, HADPH, Mg^{2+} , y la estimulación de la síntesis por bicarbonato, malónico, cítrico, biotina, etc., parecen indicar un mecanismo "de novo" vía malonil-CoA. El principal ácido sintetizado es el palmítico 16:0 y en menor proporción 18:0 y 18:1.

La síntesis "in vivo" transcurre de un modo análogo. En *Euricotis floridiana* (132), *Bombix mori* (123), *Anthonomus grandis* (124), *Drosophila melanogaster* (125), *Trichoplusia ni* (126) e *Hyalophora cecropia* (127), se sintetizaron a partir de ácido acético toda una variedad de ácidos grasos, principalmente 16:0, 16:1, 18:0 y 18:1. En estos ensayos no se detecta radiactividad en los ácidos 18:2 y 18:3, característica que parece común a todos los insectos. Además de llevar a cabo la biosíntesis "de novo", los insectos pueden elongar y desaturar ácidos grasos, en mayor o menor proporción. Así ocurre por ejemplo en *Euricotis floridiana* (122), *Anthonomus grandis* (124), *C. erythrocephala* (128), *B. mori* (129), *D. melanogaster* (125), *A. grahami* (121), *L. migratoria* (130) y *H. cecropia* (127) con probable intervención del sistema microsomal. Algunos de los ensayos anteriores "in vitro", prueban la necesidad de NADPH (NADH) y O_2 para la desaturación directa.

En algunos casos, la cantidad de ácidos monoinsaturados

obtenida a partir de acetato, es superior a la que se obtiene por deshidrogenación directa de los correspondientes saturados, como en *D. melanogaster* (131) y en *H. cecropia* (127). Estos resultados sugieren la posibilidad de que en los insectos existan dos vías alternativas para la síntesis de ácidos insaturados. Una de estas vías sería la deshidrogenación directa de los ácidos saturados, mientras que la otra puede ser semejante al sistema típico de bacterias, de desaturación de ácidos grasos de cadena corta y posterior elongación mitocondrial (131, 132).

Los ácidos sintetizados, prácticamente no se acumulan como ácidos grasos libres, sino que rápidamente se integran en estructuras lipídicas más complejas, especialmente triglicéridos y fosfolípidos (120). En general los lípidos neutros se producen en mayor proporción que los fosfolípidos, aunque ello depende en gran medida del estado de desarrollo del insecto. En larva de *H. cecropia* (127) aproximadamente el 90% de la radioactividad de los ácidos grasos sintetizados a partir de acetato, isotópicamente marcado aparece en los glicéridos; en el adulto farato aumenta la síntesis de fosfolípidos. Esto significa que la larva acumula ácidos de reserva (triglicéridos), mientras que el adulto farato, para hacer frente a su mayor complejidad fisiológica, debe sintetizar mayor proporción de fosfolípidos.

Con respecto a la variación de ácidos grasos durante las distintas fases del desarrollo, se ha visto en *Musca doméstica* (133) una tendencia general hacia la síntesis de ácidos grasos durante los primeros momentos del crecimiento larvario y una utilización subsecuente de lípidos

durante la metamorfosis del insecto.

En el caso de *Heliothis zea* (134) la incorporación de acetato en lípidos aumenta mucho al principio del 6º estado de desarrollo declinando luego a un sexto de este nivel al final de este estado y a un décimo en el adulto farato. La incorporación en triglicéridos decrece, aumentando en fosfolípidos, diglicéridos y monoglicéridos a medida que progresa la metamorfosis.

La incorporación en ácidos grasos de acetato- ^{14}C ingerido o inyectado en larva en su 5º estado larvario rinde un valor doble que el obtenido en adulto farato, siendo las moléculas saturadas las que aparecieron más marcadas (sobre todo 16:0 y 18:0) y 18:1 la más marcada de las insaturadas.

Resultados análogos han sido obtenidos en *Anthonomus grandis* (124), en *D. melanogaster* (125) en *Trichoplusia ni* (126) y en *H. cecropia* (127).

1.1.3. DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN CERATITIS CAPITATA

Los dos ácidos grasos que aparecen en mayor proporción en todos los estados de desarrollo del insecto holometábolo *Ceratitis capitata* (140) son el 16:0 (entre 20% y 36%) y el 16:1 (entre un 27 y 45%) a los que siguen en importancia 18:1 y 18:2 con unos niveles que van respectivamente de 18 a 22% y 6 a 10% según el estado de desarrollo que consideremos; continúan en importancia cuantitativa 14:0 que aparece aproximadamente en un 3.6%, 18:0 con 3-4% y 12:0 que suele representar un 1.5%. Finalmente se puede indicar que 18:3 cuyos niveles son muy bajos en los estados de larva y adulto farato, no aparece en huevo y

puede llegar a representar un 1.6% en adulto.

1.1.4. BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN CERATITIS CAPITATA

La capacidad de síntesis de ácidos grasos de homogeneizados de este insecto a lo largo de su desarrollo (138) muestra dos máximos de actividad en larva de 6 días y en adulto farato de 8 días, siendo el primero de ellos mucho más pronunciado que el segundo.

Al realizar un estudio comparativo de ambos momentos del desarrollo del insecto (135, 136) puede verse que en larva a tiempos cortos de incubación (30 minutos) existen altos niveles de 10:0, 12:0 y 14:0 los cuales disminuyen sensiblemente al aumentar ésta, mientras que 16:0, 16:1 y 18:1, que a tiempos bajos presentan valores pequeños, aumentan su cantidad paulatinamente con el tiempo de incubación hasta que a 120-180 minutos alcanzan un máximo de actividad.

Tanto 18:0 como 18:2 y 18:3 no son sintetizados en cantidades apreciables a lo largo de la incubación.

En adulto farato se obtiene cualitativamente los mismos ácidos que en larva salvo 10:0 cuyos niveles no son apreciables, mientras que cuantitativamente presentan diferencias ya que los porcentajes de 16:0 y 16:1 son muy elevados desde los primeros tiempos de incubación y prácticamente constantes durante el ensayo (80% de la actividad local). Por otro lado los ácidos grasos de cadena media tienden a incrementar ligeramente con el tiempo siendo, al igual que la larva, incapaz de sintetizar 18:2 y 18:3 y dado que éstos forman parte de la composición normal del insecto cabe pensar en un cierto carácter esen-

cial de los mismos.

Cuando se estudia la distribución de estos ácidos grasos en clases de lípidos (135, 138) utilizando como precursor acetato-¹⁴C aparece que en larva los triglicéridos contienen la mayor parte de la radiactividad en 10:0 a 16:0 con ausencia total en 18:0; en fosfolípidos no aparece 10:0 mientras que 18:0 aparece apreciablemente marcado. La composición de los ácidos grasos libres ofrece una situación intermedia entre la de los triglicéridos y fosfolípidos como corresponde a su función metabólica en la síntesis de las distintas clases de lípidos.

En adulto farato no aparece radiactividad en los ácidos grasos presentes en los triglicéridos mientras que en los fosfolípidos ésta es bastante mayor que en larva, al mismo tiempo que hay una tendencia a incrementarse los niveles de insaturación.

Cuando estos experimentos de incorporación de acetato-¹⁴C se realizan "in vivo" (136) puede verse que 16:0 y 16:1 son los que representan el máximo nivel de incorporación tanto en larva como en adulto farato.

Los ácidos grasos de cadena media tienen una incorporación semejante en los dos estados, pero los insaturados, particularmente 14:1 y 18:1, aumentan sensiblemente en adulto farato al igual que se vio "in vitro".

En cuanto a la capacidad de desaturación (139) se ha visto que los homogenizados de larva desaturan y elongan los sustratos marcados 10:0, 12:0, 14:0, 18:0, 18:1 y 18:2 de acuerdo con la longitud de su cadena, mientras que es insignificante la elongación y desaturación directa de ácidos grasos de farato adulto; resultados que con

cuerdan con los obtenidos "in vivo" tanto a partir de áci-
dos grasos marcados como de acetato. Los resultados obte-
nidos parecen indicar que la deshidrogenación directa es
la vía más importante de biosíntesis de ácidos insatura-
dos en larva, no apareciendo como un camino importante en
adulto farato.

1.1.5. BIOSÍNTESIS DE ACIDOS GRASOS EN FRACCIÓN MITOCON- DRIAL DEL INSECTO

Un estudio comparado de la incorporación de acetato-
-¹⁴C por preparaciones mitocondriales de larva y adulto
farato (141) indican que las segundas incorporan más ace-
tato marcado que las de larva, no siendo influida ninguna
de ellas por la presencia de malónico.

Los ácidos grasos sintetizados son incorporados por
las preparaciones mitocondriales de larva en diferentes
clases de lípidos según un modelo diferente al mostrado
por los homogenizados totales de larva.

Las preparaciones mitocondriales de larva incorporan
ácidos grasos principalmente en fosfolípidos en claro
contraste con la incorporación llevada a cabo por los ho-
mogenizados totales de larva en los cuales los trigliceri-
dos muestran los más altos niveles.

En cambio en adulto farato, los ácidos grasos sinteti-
zados tanto en homogenizado total, como en preparados mi-
tocondriales, lo son según el mismo modelo, ya que las
proporciones en las principales clases de lípidos se man-
tienen casi exactas para ambos tipos de homogeneizados.

De los resultados anteriormente expuestos parece dedu-
cirse que los ácidos grasos de cadena larga deben origi-

narse por mecanismos de elongación, debiendo existir además procesos de desaturación que expliquen la presencia de los ácidos grasos insaturados.

Las notables diferencias existentes en la síntesis de ácidos grasos en larva y en adulto farato parecen apuntar que dicha biosíntesis se produce en larva principalmente por un mecanismo de biosíntesis "de novo", siendo un mecanismo de elongación mitocondrial el más importante en adulto farato.

En larva el proceso de elongación-desaturación sería posterior a dicha biosíntesis "de novo" posiblemente a través de un proceso microsomal, coordinado con el anterior.

En adulto farato la síntesis de ácidos grasos de cadena larga no estaría tan coordinada con los de cadena media como en el caso anterior, siendo la mitocondria la localización fundamental de dicha síntesis de ácidos grasos en adulto farato.

Todas estas hipótesis abren una serie de líneas de investigación para su confirmación.

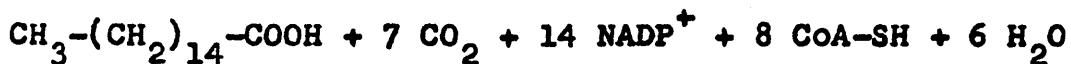
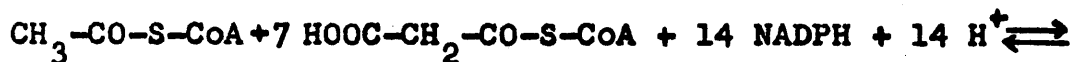
Dado que en larva el mecanismo de biosíntesis "de novo" aparece como el máximo responsable de la biosíntesis de ácidos grasos parece interesante proceder al aislamiento y caracterización de la ACIDO GRASO SINTETASA, enzima responsable de dicha biosíntesis a partir de malonil-CoA.

1.2.1. ORGANIZACION MOLECULAR DE LA ACIDO GRASO SINTETASA

Se conoce con este nombre al sistema enzimático que cataliza la biosíntesis denominada "de novo" de ácidos grasos y que se produce a partir de malonil CoA, acetil CoA

y NADPH.

La reacción global si consideramos la formación de ácido palmítico sería:



La ácido graso sintetasa ha sido identificada y aislada en una amplia serie de especies animales y vegetales así como de microorganismos, pudiendo aparecer en dos formas diferentes:

En el caso de bacterias como E. Coli, Clostridium Kluyberi, Pseudomonas, B. Subtilis y vegetales como mesocarpó de aguacate, cloroplastos de lechuga y de espinaca (1-4, 42, 43, 97) se presenta como un conjunto de proteínas que obtenidas por los métodos normales de purificación no aparecen asociadas, siendo cada una de ellas responsable de alguna de las reacciones que veremos más adelante y que en conjunto conducen a la biosíntesis de un ácido graso.

Cuando se trata de levaduras, aves, mamíferos y algunos microorganismos como M. Phlei (6-9, 31, 44, 45, 50) la enzima ha sido aislada como un complejo multienzimático que ha resistido todos los intentos realizados hasta el presente para su disociación en cadenas polipeptídicas que conserven alguna de las actividades parciales del complejo.

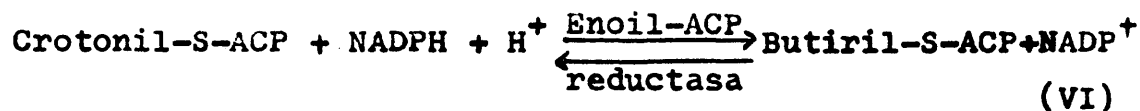
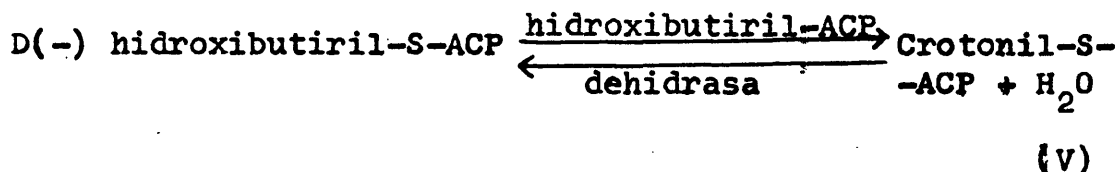
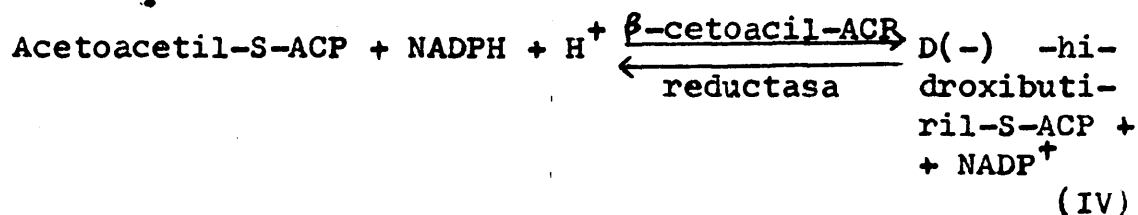
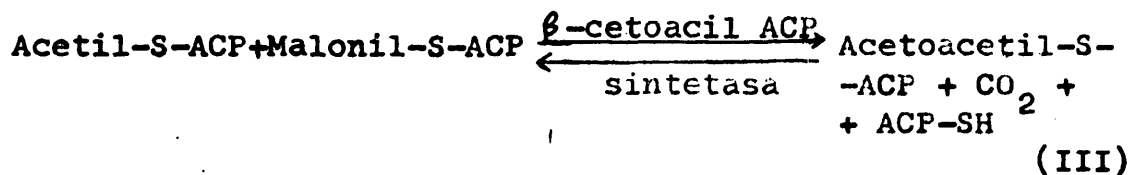
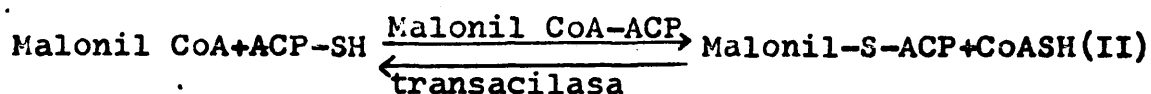
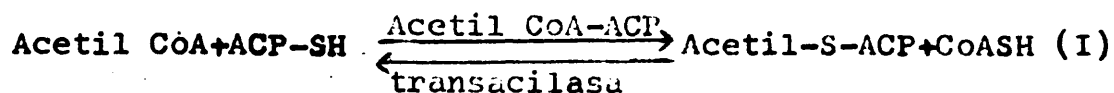
No se descarta la posibilidad de que en el primer caso se trate también de un complejo multienzimático, dado que utilizando técnicas de microscopía electrónica y autoradiografía (91) se ha visto que uno de sus componentes (ACP) está localizado en la parte interior de la membrana plasmática de E. Coli, lo cual podría representar el que "in

vivo" dicho sistema poseyera una organización similar a la encontrada en tejidos animales o en levaduras.

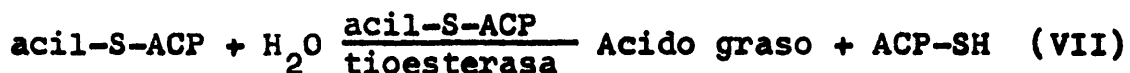
Ello tendría un significado fisiológico ya que facilitaría la transferencia de grupos acilo, una vez sintetizados, a los fosfolípidos integrantes de la membrana.

El conjunto de reacciones que se producen para pasar desde malonil CoA y acetil CoA al ácido graso han sido dilucidadas por Vagelos en E. Coli, Lynen en levaduras (fig. 1) y Porter en hígado de paloma (fig. 2), habiéndose comprobado una gran analogía entre todos ellos.

Reproducimos a continuación el conjunto de reacciones propias del sistema de E. Coli:



La anterior secuencia de reacciones se repite con sucesivas adiciones de unidades de dos carbonos desde malonil-S-ACP hasta C_{16} ó C_{18} acil-S-ACP los cuales son deacilados para producir ácidos grasos libres.



En la reacción (I) el grupo acetilo se transfiere desde la CoA a un grupo SH de la ACP para formar acetil-ACP. A continuación este acético es transferido a una cisteína de la enzima condensante (III) para formar un intermedio acetil-enzima. Queda libre ACP que recibe un grupo malonil por acción de la transacilasa a través de la reacción (II).

A continuación se produce la reacción de condensación (III) que da lugar a acetoacetyl-ACP y CO_2 .

El ácido acetilacético sufre a continuación tres sucesivas reacciones de reducción, deshidratación y nueva reducción, permaneciendo a lo largo de todas ellas unido al ACP.

El producto obtenido es butiril-ACP el cual reacciona de nuevo con la enzima condensante dando lugar a butiril-enzima, que puede a continuación reaccionar con malonil-ACP, repitiéndose de nuevo las reacciones siguientes para dar un ácido graso con dos átomos más de carbono y así sucesivamente hasta terminar la reacción que "in vitro" da ácidos grasos libres, aunque "in vivo" es probable que los acil-ACP formados reaccionen directamente con glicerol-3-fosfato y una aciltransferasa específica de membrana para formar ácido lisofosfatídico que es el primer intermediario en la biosíntesis de fosfolípidos (58).

En levadura (fig. 1) Lynen (33,46) ha indicado la existencia de dos tipos diferentes de grupos sulfhidrilo, uno perteneciente a 4' fosfopanteteína que denomina grupo central (C) y otro perteneciente a un residuo de cisteína que llama periférico (P) y que se unen a acético y malónico respectivamente que han recibido de acetil CoA y malonil CoA gracias a las respectivas transacilasas.

Ambos grupos acilo condensan para formar acetoacético y liberar CO_2 lo cual al igual que ocurría en *E. Coli* es seguido por la reducción, deshidratación y reducción de dicho acetato que permanece a lo largo de todas estas transformaciones unido covalentemente a la enzima y una vez convertido en butírico vuelve a reacciones con otra molécula de malónico repitiéndose el ciclo visto en *E. Coli* hasta la formación del ácido graso de C_{16} ó C_{18} principalmente.

El proceso termina con la transferencia de los acilos formados desde el grupo sulfhidrilo central a CoA que es la forma en la que se liberan los ácidos grasos formados en levadura.

Lynen propone que el grupo tiólico central está situado en el centro del complejo formado por las subunidades enzimáticamente activas. Los restos acilo, que permanecen unidos covalentemente a este grupo, van siendo modificados sucesivamente por los diferentes centros catalíticos.

Análisis por rayos X de bajo ángulo confirman la existencia de un espacio hueco en el interior del complejo (84).

Por microscopia electrónica (83) se ha visualizado este complejo de levadura que tiene forma ovalada con un

diámetro longitudinal de 250 Å y una anchura de 210 Å.

En hígado de paloma (59) Porter propone un mecanismo similar al de Lynen en el que además hace una serie de consideraciones conformacionales con las que trata de explicar dicho mecanismo de biosíntesis. Este cambio conformacional se supone producido cuando el grupo acetilo se transfiere de la acetiltransacilasa a la 4^L-fosfopanteteína con lo que se modificaría la interacción espacial entre los tres sitios de unión de tal manera que el grupo malónico podría ser así transferido al grupo SH de la sintetasa, que antes ocupaba el acético, reaccionando a continuación con dicho acético. Esta conformación se mantendría durante la adición de otros 6 grupos malónicos y al liberarse el palmítico los tres sitios volverían a su ordenamiento espacial inicial con lo que podría volver a iniciarse la biosíntesis de una molécula de ácido graso.

El papel que en E. Coli representaba la ACP (sobre la que hablaremos con detenimiento más adelante) viene representado en la Acido Graso Sintetasa de animales y levaduras por un grupo prostético de 4^L-fosfopanteteína unido covalentemente a la enzima (9, 12, 44, 63, 64) y que se ha visto que actúa como receptor para la transacilación de acético y malónico desde las correspondientes transacilasas. Esta 4^L-fosfopanteteína es quien proporciona en el modelo de Lynen el grupo SH central.

Dado que la levadura (5) contiene tres moles de 4^L-fosfopanteteína por mol de enzima Lynen ha sugerido la posible existencia de tres subcomplejos que con un peso molecular de 700,000 contuvieran cada uno de ellos un juego completo de enzimas.

Los sustratos utilizados por la enzima como se indicó al principio son acetil-CoA y malonil-CoA, lo cual no excluye el que en algunas especies se puedan utilizar otros sustratos, como en el caso de levadura (47) que se puede utilizar propionil-CoA dando ácidos grasos de número impar de átomos de carbono pudiendo utilizar además otros sustratos como acilCoA de 6, 8, 10, 12 ó 14 átomos de carbono aunque con un rendimiento más bajo que si se tratara del derivado de CoA de dos átomos de carbono.

En cuanto al nucleótido reducido utilizado en las dos etapas de reducción, a diferencia de las aves y mamíferos que utilizan únicamente NADPH, en E. Coli (1,15) y plantas (4) se utilizan NADPH y NADH.

Más interesante es el caso de levaduras y Mycobacterium Plei (5,50) en los que se ha identificado FMN como grupo prostético de la enzima participando en la segunda etapa de reducción.

En levadura se supone de los datos experimentales obtenidos la presencia de 4 (13) ó 5 (14) moles de este nucleótido por mol de complejo.

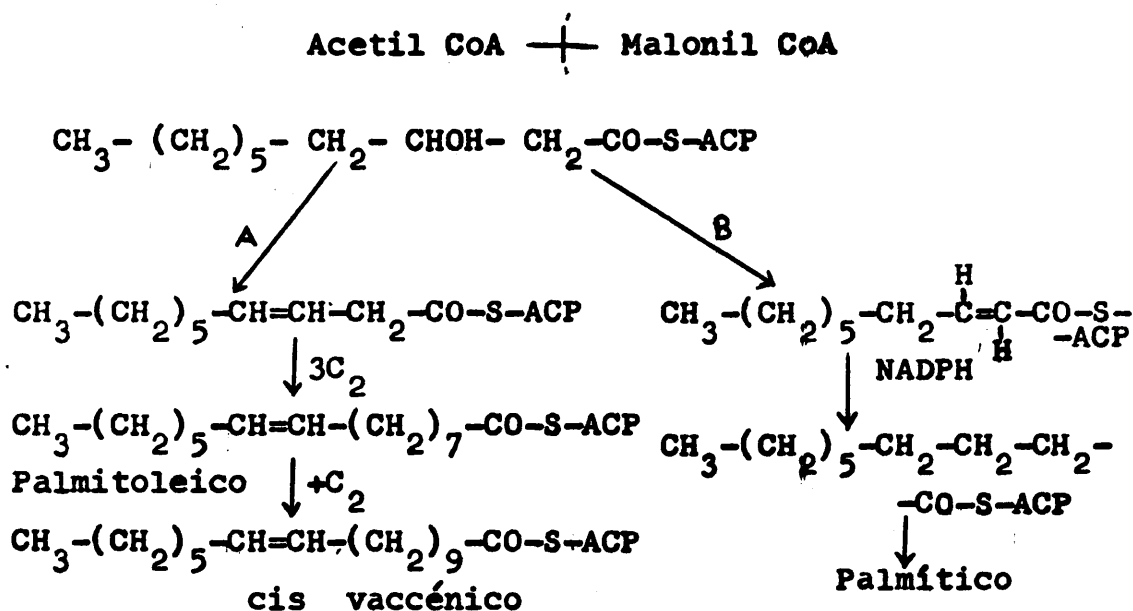
En cuanto a los productos de la reacción varían según la fuente enzimática utilizada.

Las levaduras forman acil-CoA debido a la ausencia o baja actividad de acil-CoA tioesterasa y a la existencia de una acilCoA transacilasa en el complejo enzimático que transfiere los productos finales palmítico o esteárico a una CoA.

El principal producto suele ser ácido palmítico en aves y animales (32,85) al igual que en plantas siendo el segundo producto en importancia el ácido esteárico, apa-

reciendo ambos como ácidos grasos libres,

En E. Coli aparecen como productos principales ácido es teárico y ácido vaccénico. El que no aparezca este último ácido en las otras especies parece indicar la posible ausencia en todos ellos de una β, γ dehidrasa a diferencia de E. Coli (49) en el cual ha sido identificada una β -hidroxidecanoil tiolester deshidrasa específica y que es respon sable de la síntesis de dicho ácido vaccénico.



La composición en aminoácidos varía ampliamente de unas especies a otras siendo las diferencias muy numerosas entre levadura e hígado de paloma, mientras que son muy pequeñas las existentes entre hígado de rata e hígado de paloma salvo en el número de residuos de cisteína, lo cual confirma las diferencias estructurales entre estas especies enzimáticas no pudiendo deducir de ellos ningún otro tipo de información.

1.2.2. PROTEINA TRANSPORTADORA DE GRUPOS ACILOS

Dentro de las Acido Graso Sintetasas que, una vez ais-

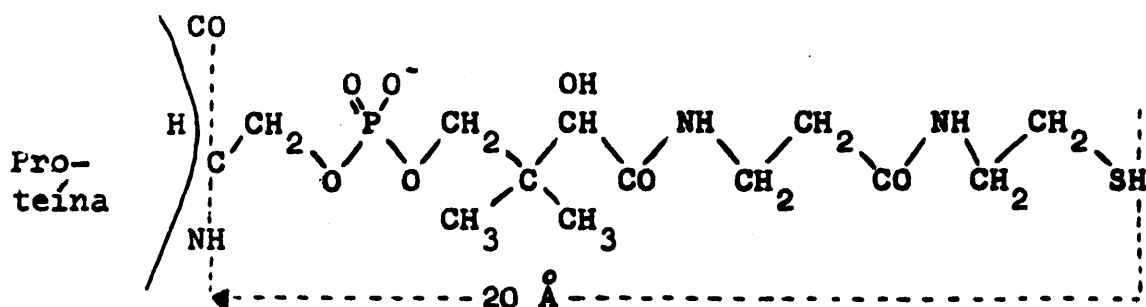
ladas, no presentan asociados sus componentes enzimáticos se ha podido distinguir una proteína transportadora de grupos acilo (acyl Carrier protein ó ACP) que dado su bajo peso molecular (9,750 daltons en E. Coli) ha sido ampliamente caracterizada tanto en bacterias (2,42) como en plantas (3,42).

Los intentos realizados para su identificación y posterior separación del complejo de Sintetasa cuando está presente como complejo multienzimático fuertemente asociado solo han dado resultados parciales en levadura (11) donde usando cloruro de guanidinio 3,5 M se ha aislado una proteína de bajo peso molecular (16,000) que contiene 4'-fosfopanteteina y cuya composición en aminoácidos es diferente a la del ACP de E. Coli y plantas no habiendo podido demostrarse su actuación como ACP en el complejo multienzimático aunque se ha visto que al igual que en E. Coli la 4'-fosfopanteteina está unida covalentemente a una serina de la apoproteína por medio de un enlace fosfodiéster.

También en Acido Graso Sintetasa obtenida de hígado de perro (184) se ha obtenido por tratamiento con SDS una proteína de peso molecular entre 9,000 y 13,500 y que contiene 4'-fosfopanteteina suponiéndose que es análoga a la ACP obtenida en los sistemas fácilmente dissociables.

El papel que juega este ACP en la biosíntesis de ácidos grasos se ha visto en el esquema de biosíntesis atribuido por Vagelos a la Acido Graso Sintetasa de E. Coli.

La característica más significativa de todos los ACP es la existencia de 4'-fosfopanteteina como grupo prostético



Los grupos acilo se unen al grupo SH final por un enlace tioéster.

El ACP ha sido obtenido de *E. Coli* (60) aguacate, espinacas, *Arthrobacter* (3,42) *C. butyricum* (61) *M. phlei* (62).

Todos ellos son ricos en residuos ácidos existiendo importantes diferencias entre ellos pues aunque los ACP de plantas y *E. Coli* son funcionalmente intercambiables los productos obtenidos varían de acuerdo con el ACP usado (42) ya que cuando se usa ACP de plantas en bacterias se obtienen ácidos grasos β -hidróximonoenoicos y β -hidroxisaturados, mientras que cuando el ACP bacteriano se usa en plantas no ocurre modificación de los ácidos grasos obtenidos.

En hígado de rata se conoce la secuencia de aminoácidos que rodea la serina que va unida a la 4^a-fosfopanteteína y de ella tan solo los dos aminoácidos adyacentes coinciden con los de la secuencia de *E. Coli*.

Cuando estos datos se comparan con la secuencia obtenida en el supuesto de ACP de levadura no existe similitud alguna entre los aminoácidos adyacentes por lo que hoy por hoy no se pueden deducir conclusiones de estos resultados.

En los últimos años se ha realizado toda una serie de estudios sobre el papel del ACP en la síntesis de ácidos grasos desde el punto de vista de la relación estructura-función del ACP.

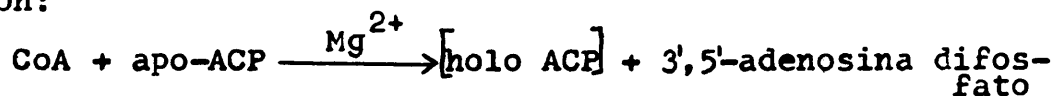
Usando ACP de E. Coli y utilizando técnicas de modificación química y análisis de los fragmentos obtenidos por medio de digestiones proteolíticas, se puede destacar entre otros importantes aspectos el papel fundamental que juega en el mantenimiento de la estructura del ACP su hexapéptido amino terminal (66).

Los más significativos avances de estos estudios han sido posibles gracias a la síntesis de la apo-ACP (péptido 1-74) por el método de fase sólida de Merrifield (67).

La holo-ACP ha sido sintetizada enzimáticamente haciendo reaccionar esta apo-ACP con CoA en presencia de holo-ACP sintetasa siendo el producto sintético así obtenido indistinguible del auténtico holo-ACP.

Se ha establecido en E. Coli (68-71) que la coenzima A es el precursor de la 4'-fosfopanteteína realizándose el intercambio de ésta rápidamente, siendo la velocidad de intercambio unas 4 veces superior a la de formación del ACP, por lo que esta velocidad de síntesis y no la de suministro de 4'-fosfopanteteína parece ser la etapa limitante.

La síntesis de holo-ACP a partir de apo-ACP y coenzima A es catalizada por la holo-ACP sintetasa según la reacción:

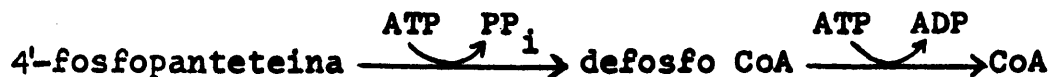


En E. Coli existe otra enzima llamada ACP hidrolasa que cataliza la hidrólisis del ACP según la siguiente reacción:



esta 4'-fosfopanteteína se convierte en coenzima A según

la reacción



La existencia de estas dos enzimas no ha podido ser comprobada en tejidos animales.

La velocidad de intercambio del grupo prostético ha sido también estudiado en hígado de rata habiéndose observado que es más rápida que la del complejo total ($t_{1/2} \approx 70$ horas) en al menos un orden de magnitud.

El intercambio cesa cuando el animal ayuna durante un período de 16 a 24 horas por lo que también en rata se le atribuye una importancia reguladora.

1.2.3. ACIDO GRASO SINTETASA FACILMENTE DISOCIABLE

Este caso se presenta, como ha quedado indicado, en bacterias y vegetales. Los componentes del complejo han podido ser obtenidos por separado y con un alto grado de purificación, lo que ha permitido un detallado estudio de cada uno de ellos, sobre el que a continuación indicaremos los detalles más significativos.

1.2.3.1. Acetil CoA-ACP-transacilasa

Ha sido purificada unas 100 veces de E. Coli (19) y es estimulada por compuestos tiólicos e inhibida por agentes alquilantes (74). Esta inhibición puede ser revertida por ésteres de CoA.

La enzima es altamente específica para acetil CoA aunque también puede actuar con propionil-CoA, butiril-CoA, hexanoil-CoA y octanoil-CoA.

Se ha propuesto que el intermediario acetil-enzima es un tioéster ya que la enzima es inhibida por N-etilmaleimida y yodoacetamida, mientras que cuando se preincuba con acetil-CoA esta inhibición por yodoacetamida decrece en un 50%.

1.2.3.2. Malonil CoA-ACP-transacilasa

Ha sido purificada a homogeneidad de E. Coli (16,74). Es inhibida cuando se incuba con compuestos tiólicos y es específica para tioésteres de malónico (ACP, CoA, panto-teína). Su peso molecular es de 36,500 y en la reacción está implicado un resto de serina al que se une el malónico (54) ya que por digestión proteolítica y posterior degradación fue identificado un resto de malonil-O-serina.

1.2.3.3. β -Cetoacil-ACP-sintetasa

También ha sido purificada a homogeneidad con un peso molecular de 66,000 (75) habiéndose podido cristalizar. Cuando se disocia con SDS o con cloruro de guanidinio da lugar a subunidades inactivas de 34,000 daltons (76).

Se ha comprobado su especificidad para toda una serie de sustratos que en el caso de los ácidos grasos saturados va de C_2 a C_{10} con una velocidad de reacción bastante alta, Cuando se usa C_{12} y C_{14} la velocidad es bastante menor, no produciéndose la reacción cuando se usa como sustrato C_{16} .

Cuando los ácidos grasos utilizados son insaturados, la enzima es activa con cis-3- decenoil ACP y cis-5-dodecenoil-ACP con una actividad similar a la que se obtiene

cuando se usan acetil-ACP y decanoil-ACP.

Sin embargo ésta disminuye mucho para hexadecenoil-ACP siendo el *cis*-11-octadecenoil-ACP completamente inactivo.

Esta enzima es inhibida por alquilación pudiendo prevenirse esta inhibición preincubando con acetil-ACP pero no con malonil-ACP, lo que indica que es el acético el que primero se transfiere al grupo -SH de la enzima produciéndose después la condensación con malonil-ACP (1) para dar la aceto-acetil-S-4'-fosfopanteteína.

La enzima es específica para derivados de ACP y no trabaja con derivados de CoA o de panteteína.

1.2.3.4. β -cetocil-ACP-reductosa

Esta enzima es independiente de NADPH. Aunque el sustrato es un β -cetoacil-ACP, los β -cetoaciltioésteres de CoA y de panteteína pueden actuar también como sustratos de la enzima, aunque actuando a velocidades más bajas (19). Los productos que forma tienen la configuración D(-) exclusivamente (17).

La enzima presenta una amplia especificidad con respecto a la longitud de la cadena, pudiendo utilizar como intermediarios β -cetoacil derivados desde C₄ hasta C₁₆ saturados (77) y los insaturados de la ruta de biosíntesis del ácido vaccénico (79).

1.2.3.5. β -hidroxiacil-ACP-dehidrasa

Esta enzima que cataliza la deshidratación de los D(-) β -hidroxiacil-ACP tioésteres para formar trans-2-enoil-ACP tioésteres es específica para este sustrato y

no metaboliza derivados de coenzima A o de panteteina siendo además la reacción estereoespecífica, dado que no es capaz de deshidratar el isomero L(+).

Como sustrato puede utilizar tanto los intermediarios de la síntesis de ácidos grasos saturados como los que conducen a una síntesis de vaccénico (78). El sustrato utilizado puede ir desde C_4 a C_{16} pero existe una disminución de actividad cuando se trata del β -hidroxidecanoil-ACP debido a que éste es un intermediario común en las rutas de biosíntesis de ácidos grasos saturados y no saturados. En esta segunda ruta existe otra enzima, la β -hidroxidecanoil tioéster dehidrasa (80) que forma cis-3-decenoil-ACP y para la que el sustrato específico es el β -hidroxidecanoil ACP por lo que compite en su utilización con la β -hidroxiacil-ACP-dehidrasa que compite en su utilización con la β -hidroxiacil-ACP-dehidrasa la cual da trans-2-decenoil-ACP. Ambas dehidrasas se encuentran en E. Coli en cantidades muy similares poseyendo unos K_M muy parecidos.

1.2.3.6. Enoil-ACP-reductasa

Ha sido purificada de E. Coli unas 250 veces. Existen 2, una dependiente de NADPH y otra dependiente de NADH (15). La primera tiene su máxima actividad con C_4 y C_6 mientras que la segunda tiene una especificidad mas amplia y aunque su actividad es baja para crotonil-ACP es mucho mayor para los derivados de longitud de cadena más larga. Otra diferencia entre las dos es que la dependiente de NADPH reduce solo los derivados de ACP mientras

que la dependiente de NADH puede utilizar también derivados de coenzima A aunque las mayores actividades se producen siempre con los acil-ACP.

1.2.3.7. Palmitil-ACP-tioesterasa

Cataliza la hidrólisis de los tioésteres que los ácidos grasos de cadena larga forman con el ACP para dar ácidos grasos libres.

La enzima ha sido purificada unas 200 veces en *E. Coli* (25) dando un peso molecular de 22,000.

Su máxima actividad fue observada con palmítico, palmitoleico y cis-vaccénico dando los correspondientes ácidos grasos libres.

Estos resultados obtenidos "in vitro" no parecen corresponderse con los de "in vivo" ya que parece ser que los ácidos grasos son transferidos directamente desde su forma de Acil-ACP a los fosfolípidos (58).

1.2.4. COMPLEJOS MULTIENZIMATICOS

A diferencia del caso de *E. Coli* y vegetales, tanto en levadura como en animales la enzima aparece fuertemente asociada después del proceso de aislamiento y purificación, no habiendo sido posible el aislamiento de las enzimas responsables de cada una de las etapas de biosíntesis de ácidos grasos por lo que para su estudio parcial ha sido necesario trabajar con el complejo multienzimático en conjunto y utilizar sustratos modelo para el estudio de cada una de dichas reacciones parciales.

1.2.4.1. Transacilaciones

Tanto en levadura (5) como en hígado de paloma (18) han sido identificadas dos subunidades diferentes, responsables de la transacilación de acético y de malónico desde Acetil-CoA y malonil-CoA respectivamente.

También se ha podido comprobar que ambas enzimas no se unen al sustrato por grupos SH ya que por un lado los agentes alquilantes tienen un bajo efecto sobre su actividad y por otro lado los sitios responsables de estas reacciones parecen haber sido identificados como grupos OH de serina o treonina (5,18,81).

Las transacilasas pasan estos restos acilo a la 4'-fosfopanteteína lo cual ha sido demostrado en hígado de paloma mediante el bloqueo de la cisteína con iodoacetamida. En esas condiciones puede verse que el grupo acetilo va tanto al grupo hidroxilo como al grupo SH de la 4'-fosfopanteteína cosa que también ocurre cuando el complejo de hígado de paloma se disocia a baja fuerza iónica (21).

Dicha transacilación de acético o de malónico a la 4'-fosfopanteteína podría venir controlada por las concentraciones relativas de ambos, quizás a través de un cambio en la capacidad de unión a la enzima debido posiblemente a algún cambio conformacional.

La especificidad por el sustrato de las transacilasas es bastante similar para todos los sistemas enzimáticos estudiados. La acetil-CoA puede ser reemplazada por homólogos de mayor longitud de cadena o por acetil-panteteína pero siempre a velocidades más lentas que aquella.

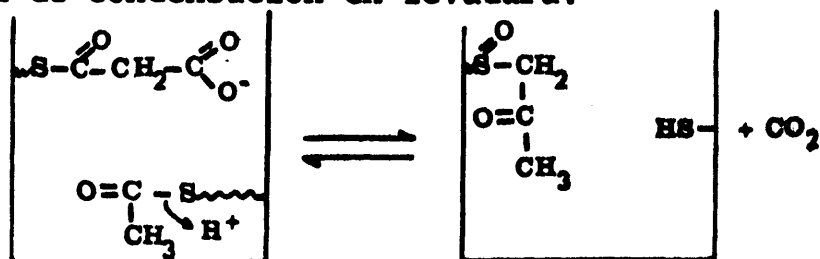
Análogamente la malonil-CoA puede ser sustituida por malonil-panteteína.

Un caso a destacar es que las acetil y malonil transacilasas de hígado de rata actúan a mayor velocidad a 0°C que cuando la reacción total se realiza a 30°C (9).

1.2.4.2. Reacción de condensación

En ella se produce la unión del acético con malónico para dar acetoacetil-panteteína y CO_2 a través de un mecanismo de reacción análogo al que ya se vio en E. Coli. Esto ha sido comprobado en levadura (5) y en hígado de paloma (22) existiendo un componente del complejo responsable de esta reacción que es la denominada β -cetoacil sintetasa o enzima condensante que participa en la reacción con un grupo SH de cisteína, el cual es mucho más susceptible a la autooxidación que la 4'-fosfopanteteína o el ACP (21, 23). Esta enzima puede ser inhibida por iodoacetamida, inhibición que puede ser prevenida o disminuida por preincubación con Acetil-CoA o sus homólogos (22).

Lynen (82) ha propuesto el siguiente mecanismo para la reacción de condensación en levadura:



En glándula mamaria de conejo (6), en hígado de paloma y de rata y en levadura (158), en ausencia de NADPH (sustrato de la siguiente reacción) el acetoacetato formado se transforma en la lactona del ácido triacético.

1.2.4.3. Primera reducción, deshidratación y segunda reducción

Estas actividades han sido también identificadas en levadura (5) y en hígado de paloma (21) utilizando como tratos modelo aciltioésteres de N-acetilcisteamina.

El NADPH es el agente reductor que usan los complejos multienzimáticos de Acido Graso Sintetasa salvo en los casos de levadura y *Micobacterium phlei* donde además del NADPH son necesarios FMN y NADH y de *Euglena gracilis* que también usa NADH junto con el NADPH.

Se ha comprobado en *Micobacterium phlei* (169) que el NADPH actúa con la β -cetoacil reductasa mientras que el NADH es utilizado en la α - β -enoil reducción en conexión con el FMN.

Ha sido establecido (32) que un ión hidruro es transferido desde la posición 4 del anillo de pirimidina del NADPH al carbono β del acilo en cada una de las reacciones de reducción. Un protón del agua es tomado por el carbono α en la segunda reducción.

Usando NADPH tritiado se ha comprobado que las dos etapas reductoras proceden estereoespecíficamente (34,35) en hígado de rata y de paloma y en levadura.

Con respecto al número de posibles sitios de unión del NADPH a la enzima se ha identificado en hígado de pollo 4 sitios de unión no interaccionantes con un K_d de $0.3 \mu M$, los cuales por tratamiento con maleato potásico o por diálisis frente a fosfato potásico 5 mM quedan reducidos a 2.5-3 lo cual indica la existencia de centros de unión para NADPH con diferentes características de estabilidad.

En hígado de paloma (30) hay dos sitios para NADPH in dependientes entre sí y equivalentes en cuanto a su actua ción, con un $K_d = 8 \mu\text{M}$ en tampón fosfato potásico 0.2 M a pH 7.0, y que a concentraciones 0.1 M ó inferiores de tam pón pasa a exhibir 3 sitios equivalentes con un $K_d = 3.5 \mu\text{M}$. Este nº de sitios sería 4 si en lugar de otorgar al complejo un peso molecular de 450,000 (8) se le diera el que inicialmente se consideró de 540,000 (32).

En hígado de rata (30) también se han visto dos pares de sitios con diferentes afinidades incluso a alta fuerza iónica con dos K_d con unos valores aproximados de 1 y 50 μM en buffer fosfato 0.2 M a pH 7.0, aunque si se baja la concentración del tampón por debajo de 0.1 M las diferen cias entre los dos K_d no son ya significativas.

La existencia de estos cuatro sitios de unión con la participación de solo dos deshidrogenasas podría explicar se suponiendo que cada subunidad del complejo tenga un juego completo de las enzimas que lo constituyen, pero en contra de esta hipótesis está el que tanto el hígado de paloma como el de rata (9,12) contienen solo un mol de 4'-fosfopanteteina por mol del complejo.

Otra posible explicación de que existiendo estos cua tro sitios actúen solo dos podría ser el que la síntesis de ácidos grasos es óptima por encima de una concentra ción de tampón fosfato superior a 0.2 M mientras que las mayores afinidades y presencia de sitios para NADPH se producen a concentración de tampón más baja, lo que po dría indicar que solo parte de los sitios de unión son operativos en la síntesis de ácidos grasos.

1.2.4.4. Terminación de cadena

Ha sido ya indicado que salvo en levadura, *Penicillium patulum* y *Euglena gracilis*, organismos en los que "in vitro" se forma acil-CoA, el que en el resto de los complejos multienzimáticos se formen ácidos grasos libres es debido a la presencia de tioésterasas que en el caso de hígado de paloma (22) y de rata (9) son altamente específicas para tioésteres de coenzima A de C_{16} y C_{18} .

En cuanto a la longitud de cadena final se supone que puede ser controlada por competición entre la reacción de condensación y la de transacilación del producto final (48,144,145).

1.2.4.5. Disociación y reasociación del complejo

La ácido graso sintetasa de levadura no ha podido ser disociada en subunidades (*) activas. La disociación en presencia de desoxicolato 0.2 M o urea 6 M da lugar a una serie de cadenas polipeptídicas de peso molecular 110,000 (46).

Se han encontrado siete aminoácidos N-terminal diferentes.

Una disociación menos drástica se ha logrado por congelación y descongelación repetida del complejo en NaCl o LiCl 1 M. El producto de esta disociación parcial tiene un peso molecular entre doscientos y doscientos cincuenta mil y fue inactivo para la síntesis de ácidos grasos.

(*) Entendiendo por subunidad una parte del complejo que conserve la actividad catalítica de éste.

La reasociación del complejo a su forma activa se puede lograr disminuyendo la fuerza iónica (48) o aumentando la concentración de proteína (38). Al disociarse presenta un incremento en el número de grupos SH probablemente como resultado de un aumento de los grupos que se exponen hacia el disolvente.

Tampoco la ácido graso sintetasa de animales ha sido disociada en subunidades activas, aunque se haya logrado disociar el complejo de hígado de paloma (37), rata (9) y pollo (29) en subcomplejos^(*) de peso molecular mitad, siendo en paloma donde más se ha estudiado este proceso por ser en esta especie donde mas fácilmente se presenta esta circunstancia.

La disociación se puede producir por conservación en 2-mercapto etanol (envejecimiento), reacción con sulfuro de carboximetilo o exposición a bajas fuerzas iónicas, alto pH o baja temperatura. Por otro lado la estabilidad aumenta por iones fosfato (39), fructosa-1, 6-difosfato (86) y NADPH (87). El mecanismo del proceso de disociación no es aún bien conocido.

La disociación puede ocurrir sin oxidación de grupos SH y la inactivación por oxidación de grupos SH puede ocurrir sin disociación (88,39). Tampoco son bien conocidas las contribuciones que tanto sobre la conformación del complejo en su forma activa como sobre el equilibrio de asociación-disociación puedan ejercer las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Aunque se ha visto que la velocidad de inactivación mas baja de la

(*) Entendiendo por subcomplejo una parte del complejo que no conserva la actividad total de éste.

enzima se produce en 18 y 25%, lo que podría significar una contribución de las interacciones hidrofóbicas en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo. Por otro lado, no parece que dicha estabilidad dependa de atracciones electrostáticas entre las cadenas polipeptídicas ya que tales uniones se debilitan por elevadas concentraciones de electrolitos, cuando en realidad el complejo es más estable en estas condiciones (39).

Los subcomplejos de peso molecular mitad obtenidos en la disociación de la ácido graso sintetasa de hígado de paloma (21) a baja fuerza iónica cataliza las mismas reacciones que la proteína intacta excepto la reacción de condensación ya que son incapaces de transferir el grupo acetilo a la cisteína, hecho que también se ha visto ocurre en levadura (14).

Esta pérdida de actividad de la enzima condensante en hígado de paloma ha sido atribuida a alteraciones en la interacción entre los sitios de 4'-fosfopanteteína y cisteína lo que impediría la transferencia desde la primera a la segunda (39).

Las dos mitades no parecen ser iguales pues los datos obtenidos en hígado de pollo (88) parecen indicar que los subcomplejos, aunque de un tamaño casi idéntico, son bastante diferentes en carga neta.

Usando Sepharosa activada con ϵ -aminocaproilpanteteína se han separado las dos subunidades de Acido Graso Sintetasa de hígado de paloma (168) una que contiene la 4'-fosfopanteteína y la actividad de β -cetoaciltransferasa reductasa y otra que contiene la actividad de acetil-CoA transacilasa. La recombinación de ambas subunidades puri

ficadas produce el complejo activo.

La disociación antes descrita es reversible mientras que la irreversible ocurre después del tratamiento con maleico (36) o detergentes como palmitil-CoA ó SDS (36, 89). La ácido graso sintetasa de hígado de paloma fue también disociada por tratamiento con fenol-ácido acético-urea (8) y sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida en el sistema de ácido acético de Takayama y col. (90) habiéndose visualizado 8 bandas. Por otro lado el análisis de los grupos N-terminales dió al menos cinco DNP-aminoácidos (8).

En preparaciones de hígado de paloma a alta concentración de tampón con DTT 10 mM (37) se puede reasociar el complejo siendo absolutamente necesaria la presencia de DTT si la asociación se produjo en presencia de β -mercapto etanol lo cual está de acuerdo con la pérdida observada de 5 ó 6 grupos SH en los subcomplejos (37).

A partir de hígado de rata (27) parece haberse obtenido dos péptidos con actividades de acetil y malonil-CoA transacilasa.

La enzima puede perder actividad lentamente por "envejecimiento" (31,36), lo cual ha sido atribuido a la oxidación de grupos SH.

La estabilidad del complejo de hígado de paloma aumenta por conservación a -10°C en presencia de DTT 10 mM a pH 7. Sin embargo, la estabilidad de las preparaciones de hígado de rata requiere una concentración de tampón fosfato bastante más alta (0.5 M) mientras que la de hígado de pollo ha sido estabilizada (7) en presencia de glicerol al 20%.

1.2.4.6. Etapla limitante de la velocidad de síntesis de ácidos grasos

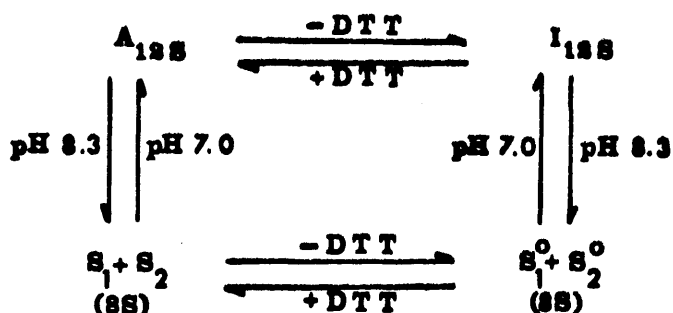
De acuerdo con los resultados obtenidos en E. Coli (16,23) parece ser que la transacilación del acético es la etapa limitante del proceso de biosíntesis de ácidos grasos dado que los acilCoA derivados de C_2 a C_8 se convierten en ácidos grasos a velocidades que disminuyen según va aumentando la longitud de la cadena carbonada, siendo esta velocidad de disminución paralela a la de transacilación del ACP. Además la velocidad de actuación de la acetil CoA-ACP-transacilasa es junto con la de desacilación de ACP la más lenta de todas las reacciones de la síntesis de ácidos grasos por lo que tampoco puede descartarse que fuera esta última reacción la etapa limitante. Una última posibilidad de regulación podría ser que las actividades enzimáticas se alteren en el posible complejo multienzimático existente "in vivo".

Los intentos de reconocimiento de la etapa limitante en levadura, aves y mamíferos han conducido en levadura a la suposición (5,13) de que la etapa limitante es la reacción de condensación pero los datos poseídos hasta el momento son insuficientes.

En hígado de paloma (21) se observa que al disociarse la sintetasa en dos mitades iguales solo la reacción de condensación y la síntesis total de ácidos grasos se eliminan en los subcomplejos siendo la K_m aparente de las otras reacciones similar en el complejo y en las subunidades. La ausencia de condensación es debida a que no se produce la transferencia del grupo acetilo a la cisteína

por lo que ésta podría ser la etapa limitante, aunque en principio también podría serlo la desacilación de palmitoil CoA cuya velocidad en hígado de paloma es muy similar a la de síntesis de ácidos grasos. Pero esto no ocurre en rata (28) donde esta enzima actúa con una velocidad 5 veces mayor que la de síntesis total de ácidos grasos. Todas estas observaciones conducen a considerar la condensación como la etapa limitante.

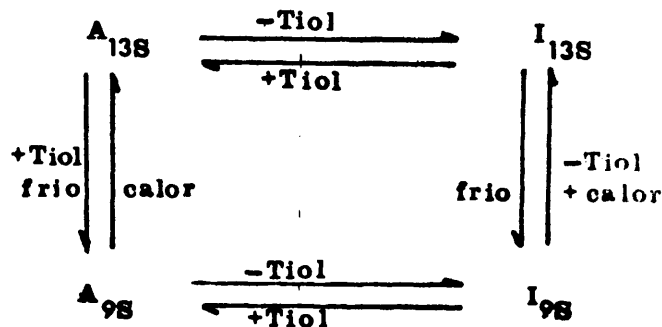
Cuando se estudió esta disociación en hígado de pollo (88) pudo verse la disociación del complejo (12S) en glicocola-Tris a baja fuerza iónica y pH 8.3 dando dos subcomplejos (8S) del mismo tamaño y diferente carga neta. Existiendo varias formas moleculares interconvertibles por alteraciones de pH, fuerza iónica y grupos tiólicos cuyo esquema de reacción puede verse en la figura siguiente:



El que la disociación del complejo tenga lugar bajo condiciones de elevado pH y baja fuerza iónica (favorecedoras de la repulsión en la molécula negativamente cargada) parece implicar el que las interacciones iónicas juegan un papel importante en la unión de los subcomplejos, pudiendo dar lugar la oxidación de los grupos tiólicos a cambios conformacionales responsables de la disminución

de la capacidad de los subcomplejos oxidados para la reconstrucción de éste.

El equilibrio asociación-disociación bajo la influencia de diferentes factores se ha visto también en glándula mamaria de rata lactante (112) que presenta la propiedad de ser un complejo multienzimático lábil al frío, propiedad que exhibe también en el complejo de hígado de rata. Estos hechos se resumen en el siguiente esquema:



En este caso la disociación no implica oxidación de grupos SH de la proteína.

1.2.4.7. Control de la actividad del complejo Acido Graso Sintetasa

Los estudios realizados "in vivo" con animales parecen indicar la existencia de cambios notables en la síntesis de ácidos grasos sintetizados "de novo" en diferentes estados nutricionales y de desarrollo del animal.

En los estudios realizados en rata y ratón (92,93,94) se ve un gran aumento de la biosíntesis cuando los animales son alimentados con una dieta libre de grasas y una notable disminución en ayuno o con una dieta rica en grasa.

También se han apreciado cambios de actividad de la Sintetasa durante el desarrollo del hígado y cerebro de

rata (165), hígado de rata y ratón (96,95,165) e hígado de pollo (166).

La actividad de la enzima aumenta extraordinariamente en hígado después del destete de la rata o del ratón o de la eclosión del pollo al pasar de una alimentación rica en grasa (leche materna en el caso de los mamíferos) a otra de bajo contenido en grasa.

En cerebro la máxima actividad ocurre al final de la vida fetal y la actividad específica va disminuyendo a medida que el animal va progresando en su vida adulta lo que implica una regulación diferente que en hígado.

Otro tipo de experimentos realizados "in vivo" para conocer la posible regulación de la ácido graso sintetasa son los realizados sobre la velocidad de síntesis y degradación de la enzima.

La cantidad de enzima presente en hígado de paloma y rata está correlacionada con la actividad enzimática obtenida (107,108,109).

Cuando se observa la variación que exhibe la actividad enzimática frente a una alimentación rica en grasa a ratas previamente ayunadas, se ve que aquélla aumenta como resultado de un proceso de síntesis adaptativa de la enzima, lo cual se comprueba por la supresión de esta síntesis en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas (107,111).

En condiciones de ayuno la velocidad de degradación aumenta (109) hasta alcanzar a las 48 horas un estado estacionario.

Parece ser que bajo las condiciones de estado estacionario los niveles de Ácido Graso Sintetasa hepática son

regulados primariamente por la velocidad de síntesis enzimática más que por la velocidad de degradación (109,111) la cual puede jugar un papel en el control de la enzima durante períodos de transición de un estado estacionario a otro tal como pudiera ser el de ayuno.

Variaciones en la eficiencia del intercambio de la 4'-fosfopanteteína entre coenzima A y Acido Graso Sintetasa se producen en hígado pero no en cerebro de rata. Un aumento en el intercambio se origina durante una alimentación libre de grasas y una disminución durante el ayuno. También se ha visto por métodos inmunológicos que cambios en el contenido enzimático (161) inciden sobre la actividad enzimática.

En tejidos animales se han hecho investigaciones sobre la posibilidad de regulación por hormonas del tiroides, adrenales y por insulina así como por niveles de AMP_c (95,97,98,99) y aunque se ha obtenido toda una serie de resultados sugestivos no puede decirse que se conozca su posible mecanismo de actuación sobre la sintetasa.

La posible regulación alostérica de la sintetasa ha sido ampliamente postulada.

En presencia de azúcares fosforilados, en especial fructosa-1,6-difosfato se ha observado una estimulación de la sintetasa tanto en hígado de pollo como en E. coli (100,101) la cual se supone ocurre por eliminación de la inhibición de la enzima por exceso de Malonil-CoA, debido a un cambio conformacional. Estos resultados, que no parecen tener significado en condiciones de experimentación fisiológicas no han podido ser tampoco confirmados en la enzima purificada de hígado de ratón o de paloma (30,59).

También se ha postulado la posibilidad de una retroinhibición por palmitoil CoA que es el producto final de la reacción. Esta inhibición fue vista en levadura (102), hígado de paloma (89) y de rata (103) y de cerebro de rata (104) lo cual podría relacionarse con el que en condiciones de ayuno o dieta rica en grasa, en las cuales la actividad de Acido Graso Sintetasa era baja los niveles de acil-CoA aparecen elevados notablemente (103,105).

Esta inhibición en el caso de levadura es competitiva con respecto a malonil-CoA, siendo disminuida en presencia de albúmina de suero.

El hecho de que el centro activo de ambas transferasas tenga los mismos aminoácidos ha hecho suponer que malónico y palmítico son transferidos por la misma enzima, lo cual podría explicar la competencia entre malonil-CoA y palmitoil-CoA (146). En contra de esta hipótesis está el hecho de que esta competencia puede ser por el grupo tiólico del complejo en vez de por el centro activo de la transferasa (47).

En el caso de hígado de paloma (89) la inhibición depende de la razón molar de palmitoil-CoA a proteína lo que sugiere que la actuación de la palmitoil CoA ocurre a modo de detergente y no como inhibidor específico ya que la inhibición irreversible que se produce es similar a la producida por el dodecil sulfato sódico.

La palmitoil-CoA es también un potente inhibidor de la Acido Graso Sintetasa de *Corynebacterium diptheriae* siendo esta inhibición revertida por polisacáridos. Esta inhibición se produce también a nivel de malonil transacilasa (143).

1.3. ESPECIES EN QUE HA SIDO IDENTIFICADA LA ACIDO GRASO SINTETASA

A lo largo de la presente introducción ha quedado pues to de manifiesto el aislamiento de la Acido Graso Sintetasa de toda una serie de organismos.

El que hasta el momento actual solo se haya realizado un estudio profundo de un pequeño número de estas entidades, junto con el que las especies en las que han sido identificadas no sea un número lo suficientemente amplio, ha impedido la realización de cualquier tipo de estudio de la variación de sus propiedades a lo largo de la evolución.

Sin embargo sí han podido apreciarse algunas diferencias entre los sistemas multienzimáticos hasta el presente aislados, la más importante de las cuales es que una vez realizado el proceso de aislamiento el sistema aparece fuertemente asociado como complejo multienzimático (hongos, levaduras, animales y algunas bacterias) o disociada en cada uno de los componentes del agregado multienzimático (vegetales y bacterias).

1.3.1. ACIDO GRASO SINTETASA DE VEGETALES

En todos los vegetales hasta el presente estudiados, patata, mesocarpio de aguacate, cloroplastos de lechuga y espinacas (3,4,42,43) ha aparecido la Sintetasa como un conjunto de enzimas separadas, sobre las cuales se han realizado toda una serie de estudios parciales. Los ácidos grasos sintetizados son principalmente palmítico y esteárico, utilizando como sustratos acetil-ACP y malonil-

-ACP y como agentes reductores NADH y NADPH.

1.3.2. ACIDO GRASO SINTETASA DE BACTERIAS

El sistema más extendido en bacterias de síntesis de ácidos grasos es el disociado que ha sido identificado en *Clostridium Kluyveri*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis* y *E. coli* (1,2,40). Este último es el caso de Acido Graso Sintetasa disociada más estudiada hasta el presente como ya se vio anteriormente.

Todas ellas usan como agentes reductores NADH y NADPH sintetizando una amplia variedad de ácidos grasos en función de la especie considerada. *E. coli* produce principalmente ácidos vaccénico y esteárico, aunque también produce β -hidroxiácidos entre C_{10} y C_{14} .

B. subtilis (40) es un caso especial debido a que produce principalmente C_{15} y C_{17} ramificados con un metilo en posición iso o anteiso con respecto al metilo final. Esto parece ser debido a que el sustrato utilizado por esta enzima parece no ser acetil-CoA sino los acil derivados ramificados 2 metil-butanoil-CoA, isobutiril-CoA e isovaleril-CoA los cuales tienen un cierto significado metabólico ya que son intermediarios en la degradación de isoleucinavalina y leucina respectivamente.

La Acido Graso Sintetasa ha sido también aislada como complejo multienzimático de *Corynebacterium diphtheriae* (167) cuyo peso molecular está entre 2.5×10^6 y 3.0×10^6 sintetizando principalmente ácido palmítico y requiriendo como nucleótidos reducidos NADH y NADPH.

También a partir de *Micobacterium phlei* ha sido aislada en forma de complejo multienzimático con un peso mole-

cular de 1.7×10^6 , habiéndose identificado 4'-fosfopanteína y observado su disociación en tampones de baja fuerza iónica (menor a 0.1 M) debido probablemente a la fragmentación del complejo en unidades de peso molecular más pequeño (50). Una característica que diferencia este complejo de los aislados de otras especies es que sintetiza ácidos grasos de número par de átomos de carbono entre C_{14} y C_{26} pudiendo variar la proporción relativa de los más cortos (C_{14} a C_{18}) con respecto a los más largos C_{20} a C_{24} con o sin cambios de la actividad total de la sintetasa. Dichos ácidos grasos aparecen como acil-CoA.

En presencia de una serie de polisacáridos MMP (3-o-metil manosa) y NGLP (6-o-metil glucosa) aumenta la proporción de los de cadena corta frente a los de cadena larga. Los monómeros de estos dos polisacáridos junto con manosa aparecen asociados a la enzima a lo largo de su aislamiento. Todos ellos forman parte de la pared bacteriana y su acción reguladora se supone a nivel de la formación de un complejo con palmitoil-CoA por lo que la transacilasa con afinidad máxima para C_{16} competiría con otra con afinidad hacia C_{24} y se produciría más proporción de C_{16} que anteriormente.

Requiere FMN para la segunda reducción acoplado con NADH, mientras que en la primera reducción participa NADPH.

Esta enzima es también capaz de elongar octanoil-CoA, estearil-CoA y palmitoil-CoA.

Una segunda Acido Graso Sintetasa ha sido aislada de este organismo con un peso molecular 250,000 cuya actividad depende de la adición de ACP, el cual es fácilmente

aislable de los extractos crudos con un peso molecular de 10,450 y posee propiedades similares a las de otras fuentes bacterianas. Esta enzima usa solo palmitoil-CoA o estearil-CoA pero no acetil-CoA como sustrato y podría ser el resultado de la disociación de la primera.

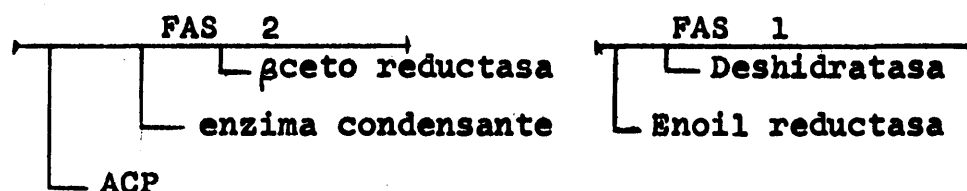
1.3.3. ACIDO GRASO SINTETASA DE HONGOS Y LEVADURAS

Los estudios realizados con hongos han conducido a la identificación de la Acido Graso Sintetasa como complejo multienzimático de peso molecular 2.6×10^6 daltons a partir de *Penicillium patulum* (183) y a otro complejo multienzimático de *Pythium debaryanum* (182) que tiene un peso molecular de un orden de 4×10^6 , requiriendo para su actuación acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH y no siendo dependiente de ACP para su actividad. Produce C_{14} y C_{16} tanto libres como esterificados. Si se trata con detergentes o enzimas proteolíticas no se disocia en subunidades activas. Puede usar también como sustrato propionil-CoA pero no butiril-CoA.

Uno de los complejos de Acido Graso Sintetasa de los que más conocimiento se posee en la actualidad es el obtenido de levadura de panadería (33,46); este complejo tiene un peso molecular de 2.3×10^6 y se ha postulado su estructuración a base de tres conjuntos funcionales idénticos dado que se ha observado la presencia de 3 moles de 4'-fosfopanteteína por mol de enzima. De este complejo se ha aislado una proteína de peso molecular 16,000 por tratamiento con cloruro de guanidinio y se supone se trata del correspondiente ACP. Otro dato característico de este sistema es la participación de FMN en la segunda reduc-

ción.

Desde el punto de vista genético se conoce que el complejo multienzimático viene codificado por dos loci distintos que no están unidos entre sí en el genoma; cada uno de dichos loci codifica más de una de las enzimas componentes del complejo (170), teniéndose conocimiento en el momento actual de la localización de las siguientes enzimas:



El posterior estudio (171,172) de la composición en subunidades de la Acido Graso Sintetasa ha sugerido que los dos loci sean capaces de codificar cadenas polipeptídicas multifuncionales y no los componentes enzimáticos individuales del complejo.

1.3.4. ACIDO GRASO SINTETASA DE FITOFLAGELADOS

Se ha visto que en el caso de *Chlamydomonas reinhardtii* la Acido Graso Sintetasa es dependiente de ACP poseyendo también un sistema de elongación dependiente de palmitoil CoA; en este alga los ribosomas de los cloroplastos parecen ser los responsables de la biosíntesis de la enzima.

Un especial interés ofrece el caso de *Euglena gracilis* (55) por tratarse de un fitoflagelado unicelular que tiene características potenciales animales y vegetales dado que cuando crece a la luz se forman cloroplastos, cosa que no ocurre cuando el crecimiento del microorga-

nismo se produce en la oscuridad.

En este segundo caso la Acido Graso Sintetasa aparece como un complejo multienzimático (I) de peso molecular superior a 650,000, produciendo ácido palmítico como producto principal. Es estimulada por FMN y es más activa en presencia de NADPH y NADH que en la de cualquiera de ellos por separado.

Cuando crece a la luz se aíslan dos sintetetasas, la anteriormente descrita y otra de menor tamaño (II) que requiere ACP para su actuación y produce esteárico y araquidónico de modo principal y se parece a la de vegetales y plantas. Tiene un peso molecular de 3.6×10^5 y parece estar débilmente asociada. En cuanto al ACP ha sido purificado (164) y tiene un peso molecular de 10,400.

Al igual que en el caso de la Sintetasa de Chlamydomonas reinhardtii se ha visto que esta sintetasa dependiente de ACP se sintetiza en los ribosomas de los cloroplastos (56).

Además de estas dos Sintetetasas se ha detectado una tercera (III) dependiente de ACP y que cataliza la elongación de acil-CoA desde C_{10} si bien es incapaz de utilizar acetil-CoA. Actúa tanto en células crecidas a la luz como a la oscuridad, se localiza en los cloroplastos y sirve para elongar hasta $C_{18}-C_{24}$ los ácidos grasos obtenidos mediante la acción de cualquiera de las dos Acido Graso Sintetetasas anteriormente descritas.

Existe evidencia de que ésta y la II operan en conjunto para producir los ácidos grasos requeridos por la membrana del cloroplasto. El requerimiento en ACP de II y III puede ser satisfecho por ACP de E. coli.

1.3.5. ACIDO GRASO SINTETASA DE AVES

Ha sido aislada como complejo multienzimático de hígado de pollo (7) con un peso molecular de 508,000 y usa como sustratos acetil-CoA y malonil-CoA. Como agente reductor usa únicamente NADPH y produce ácido palmítico principalmente.

De hígado de paloma ha sido también aislada como complejo multienzimático (31) con un peso molecular de 450,000. Usa como sustratos acetil-CoA y malonil-CoA y como agente reductor únicamente NADPH. Produce principalmente C₁₆ y algo de C₁₄ y C₁₈ bajo la forma de ácidos grasos libres dado que posee una palmitoil tioesterasa; puede producir también palmítico a base tan solo de malonil-CoA y NADPH rindiendo un 25% de su producción normal debido a la actuación de una malonil-CoA descarboxilasa. Es capaz de sintetizar, en ausencia de NADPH, la lactona del ácido triacético a partir de acetil-CoA y malonil-CoA (9).

Un detallado estudio de este sistema se ha realizado en la presente introducción al examinar los complejos multienzimáticos en general, debido a ser el complejo multienzimático de Acido Graso Sintetasa más estudiado hasta el presente junto con el de levadura.

1.3.6. ACIDO GRASO SINTETASA DE MAMIFEROS

En mamíferos ha sido identificada en hígado, tejido adiposo, cerebro, aorta, intestino y glándula mamaria suponiéndose que está ausente en corazón donde también se ha intentado identificar (188).

La purificación de la enzima se ha realizado a partir de hígado y glándula mamaria. En el primer caso la purificación se ha realizado a partir de hígado de cerdo (157) en el que aparece como complejo multienzimático de peso molecular 5.0×10^5 que exhibe además de su capacidad de biosíntesis de ácidos grasos, palmítico principalmente, otra de óxidoreductasa dependiente de NADPH hacia cetonas alicíclicas; esta actividad se adscribe al componente β -cetoacil-ACP-reductasa del complejo multienzimático.

La ácido graso sintetasa de hígado de rata es de todas las de hígado de mamíferos la que ha sido objeto de estudio más profundo. Ha sido aislada como complejo multienzimático (9) con un peso molecular de 540,000 siendo palmítico libre el ácido graso que se produce en mayor proporción. Al igual que ocurría con la de hígado de paloma posee actividad de malonil-CoA descarboxilasa y sintetiza la lactona del ácido triacético a partir de acetil-CoA y malonil-CoA en ausencia de NADPH, único agente reductor que utiliza esta enzima.

Un dato a destacar es que los aminoácidos que se encuentran alrededor de la 4'-fosfopanteteina son los mismos que aparecen en la zona correspondiente del ACP de E.coli.

El aislamiento de la Acido Graso Sintetasa de hígado de perro (184) presenta el interés de que es el primer complejo multienzimático de mamíferos en que se ha aislado una proteína con función equivalente a la del ACP del complejo fácilmente dissociable.

También de hígado humano ha sido aislada la Acido Graso Sintetasa (156) con un peso molecular de $410,000 \pm 20,000$ produciendo principalmente ácido palmítico libre. Se ha

identificado la existencia de 4'-fosfopanteteina y utiliza como sustrato tanto acetil-CoA como butiril-CoA.

Butiril-CoA es incluso más efectivo que acetil-CoA, cosa que también ocurre en preparaciones de glándula mamaria y de hígado de conejo y rata (152,153), habiéndose comprobado en estos casos que el 90% de la acetil-CoA se convierte en butiril-CoA antes de la condensación con malonil-CoA.

En trabajos realizados con glándula mamaria de cabra (150) se ha observado en la fracción soluble la presencia de enzimas que catalizan el reverso de la β -oxidación, esto es, acetoacil-CoA tiolasa, acetoacil-CoA reductasa dependiente de NADH y crotonil-CoA hidrasa.

Esto parece ir en contra de la consideración generalmente admitida de que acetil-CoA es junto con malonil-CoA el sustrato universal de la reacción. Esta idea se debe a que las primeras investigaciones se realizaron con bacterias, hígado de paloma y levadura donde la presencia de acetil-CoA como sustrato generalizó la impresión de su empleo en todas las demás sintetetasas.

La peculiaridad que la glándula mamaria exhibe de sintetizar ácidos grasos de cadena media y corta presentes en los triglicéridos de la leche, ha hecho objeto a la Acido Graso Sintetasa de este tejido de una particular atención. En el caso de rata (147) se ha aislado con un peso molecular de 478,000 apareciendo muy similar en cuanto a sus propiedades a los complejos purificados de hígado de paloma y rata. Es lábil al frío y se disocia recuperándose la actividad entre 20°C y 30°C (149). Sintetiza además de palmítico ácidos grasos de cadena corta y media.

De cobaya (162) se ha aislado con un peso molecular de 400,000. Sintetiza ácidos grasos en cantidades apreciables desde C_4 a C_{18} , siendo C_{16} el producto predominante.

A partir de vaca (159) ha sido aislada con un peso molecular de 450,000 observándose que cuando la relación Acetil-CoA/malonil CoA disminuye, la longitud de la cadena de los ácidos grasos producidos también disminuye; hecho que ocurre asimismo a partir de glándula mamaria de otros orígenes. Butiril-CoA se forma en cantidad apreciable mientras que los ácidos grasos comprendidos entre C_6 y C_{12} aparecen en pequeñas cantidades.

La Acido Graso Sintetasa aislada de glándula mamaria de conejo (6) se diferencia de las anteriores en que tiene un peso molecular de 9.1×10^5 . El principal ácido graso producido es C_{14} pero también sintetiza cantidades significativas de ácidos grasos de cadena media y corta.

La formación de ácidos grasos de cadena media y corta por la Acido Graso Sintetasa de glándula mamaria parece ofrecer un mecanismo singular en este tejido y que, quizás, pueda deberse a algún factor extrínseco a la proteína misma ya que ésta, una vez purificada, sintetiza principalmente ácido palmítico (6,10). Uno de estos factores podría ser la Acetil-CoA carboxilasa (154) ya que como se indicó anteriormente la relación de Acetil-CoA/malonil CoA influye "in vitro" sobre la terminación de la cadena.

También podría deberse a una especificidad de las tioquimasas por una determinada longitud de cadena o de las acil-transferosas que participan en la síntesis de fosfolipídeos y triglicéridos (149).

Cuando la síntesis de ácidos grasos se investiga con homogeneizados libre de células de glándula mamaria de conejo, o fracción microsomal y sobrenadante, o bien éste último, se obtiene una alta proporción de C_8 y C_{10} que aparecen en la leche en un 65% (6). Esto ocurre cuando se usa una concentración alta de proteínas; al disminuir la concentración a menos de 1 mg/ml se produce un progresivo aumento de la proporción de $C_{14:0}$ y $C_{16:0}$ por lo que la síntesis podría venir controlada por algún factor presente en la fracción sobrenadante.

1.3.7. ACIDO GRASO SINTETASA DE PECES

Se ha aislado del hígado de *Pleuronectes platessa* (199) mostrando un peso molecular de 4.8×10^5 .

1.3.8. ACIDO GRASO SINTETASA DE INSECTOS

Aunque sobre la biosíntesis de ácidos grasos en insectos se han realizado toda una serie de estudios en una amplia variedad de especies, hasta el presente no se ha llevado a cabo el aislamiento y caracterización de la Acido Graso Sintetasa. El desconocimiento de este sistema enzimático puede hacerse extensivo a los invertebrados en general.

Así, pues, el aislamiento, caracterización y estudio de los requerimientos funcionales de la actividad del sistema Acido Graso Sintetasa del insecto *Ceratitis capitata* ha constituido el elemento central de la investigación objeto de esta Tesis Doctoral.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. CULTIVO DEL INSECTO

El material biológico utilizado a lo largo de toda la experimentación, ha sido el insecto holometabolo *Ceratitis capitata*, criado artificialmente en el laboratorio.

Las condiciones ambientales de luminosidad, temperatura (27°C), humedad (saturación) así como las dietas alimenticias empleadas se mantienen constantes para lograr la máxima constancia posible en el ciclo de reproducción del insecto.

Los huevos se siembran en bandejas con una dieta alimenticia compuesta por:

Sacarosa	150 g
Hidrolizado de levadura de cerveza	15 g
Salvado	455 g
Agua	550 ml
ClH al 1%	10 ml
Levadura de pan	6 g
Suero de leche	50 g
Nipagin	1 g
Nipasol	1 g

Las larvas eclosionan antes de las 48 horas y se desarrollan en este medio, atravesando cuatro estados larvarios.

Al cabo de 8 días saltan espontáneamente, siendo recogidas sobre depósitos que contienen serrín. La larva, que había dejado de alimentarse, se introduce en él para pupar, endureciendo su cutícula hasta quedar inmóvil.

En pocas horas, pasando por un estado de prepupa se transforma en pupa-farato. Según Hinton (176), en dípteros este estado dura algunas horas, para aparecer a con-

tinuación los caracteres morfológicos del adulto (adulto farato). En esta fase se formará dentro del pupario lo que será el insecto adulto.

Al cabo de 9 días se produce la emergencia del insecto rompiendo la cutícula que lo envuelve. Se mantienen en jaulas apropiadas, con dietas sólidas de sacarosa e hidrolizado de levadura en proporción 4:1. El agua se aporta embebida en un gel de agar.

Después de 7-8 días alcanzan su madurez sexual ocurriendo la copulación y el comienzo de un nuevo ciclo con la puesta de los huevos. Estos son posteriormente sembrados en nuevas bandejas.

2.2. VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN PREPARADO ENZIMATICO TOTAL DEL INSECTO A LO LARGO DE SU DESARROLLO

2.2.1. PREPARACION DE HOMOGENIZADOS TOTALES

Una vez limpios los insectos, como se describirá en 2.3.1., se procede a su homogenización en un Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón, en solución tampón Tris 0.05 M a pH 7.4 en proporción variable según la fase de desarrollo del insecto, de modo que resulte una concentración de proteínas de 20 mgr/ml. Todas las operaciones se realizan en baño de hielo.

Los homogeneizados brutos se filtran por tres capas de gasa a tubos de centrífuga con el fin de eliminar restos groseros. Los filtrados se centrifugan 10 minutos a 1,500 g en una centrífuga Sorvall refrigerada entre 0° y 2°C.

El sobrenadante se considera como un preparado enzimático total. Se homogenizan 22 etapas del desarrollo del insecto, huevo, 4 de larva (4, 5, 6 y 7 días) 1 de pupa, 9 de adulto farato (cada día) y 3 de adulto (de 1, 5, 10 días), es decir, una representación del ciclo completo tal como se desarrolla en la multiplicación artificial en el laboratorio.

2.2.2. VALORACION DE ACETIL-CoA CARBOXILASA

La mezcla de incubación contiene por ml de incubación 6 μ moles de ATP, 2 de Cl_2Mg , 3 de citrato, 10 de CO_3HK (4 μCi), 2.5 de mercapto etanol, 20 de fosfato potásico a un pH de 7.4 y 10 mg de preparado enzimático total en un volumen final de 0.5 ml.

La incubación se realiza durante 30 minutos en un baño de agua a 37°C deteniéndose la reacción con la adición de 0.1 ml de ClH 6N. El contenido del vial de incubación se lleva a sequedad en un desecador a vacío y se añaden 2.5 ml de líquido de centelleo formado por 10.5 g de PPO, 0.45 g de POPOP, 150 gr. de naftaleno, dioxano hasta 1,500 ml de solución y agua hasta 1,800 ml.

El conteaje de radiactividad se realiza en las condiciones descritas en 2.7.4.

2.2.3. VALORACION DE ACIDOS GRASOS TOTALES

La mezcla de incubación contiene por ml de incubación 6 μ moles de ATP, 2 de Cl_2Mg , 2 de acetato sódico (5 μCi), 3 de citrato, 1 mg de estreptomicina, 20 de fosfato potásico a un pH final de 7.4 y 10 mg de preparado enzimático total en un volumen final de 1 ml.

La incubación se realiza a dos tiempos (30 y 120 minutos) en un baño de agua a 37°C.

La reacción se detiene con 2.1 ml de metanol y 1 ml de cloroformo y la extracción de los ácidos grasos formados, así como su posterior conteaje se realizan según el método descrito en 2.7.3.1. y 2.7.4.

2.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA ACIDO GRASO SINTETICA SA

2.3.1. HOMOGENEIZACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

Previamente los insectos se limpian adecuadamente según su estado de desarrollo.

La larvas utilizadas son de 6 días. Manualmente se elimina la mayor parte de la dieta y se transfieren a un tamiz de malla apropiada colocado sobre un recipiente. Durante 2 a 3 horas las larvas van atravesando el tamiz, siendo recogidas en el recipiente inferior del cual son transferidas a bolsas de plástico donde son congeladas en aire líquido y se conservan a -60°C hasta su posterior utilización.

Los adultos faratos utilizados de 5 y 8 días se separan del serrín por decantación con agua, lavándose posteriormente varias veces con agua destilada y guardándose a continuación en congelador a -60°C.

En el momento de su utilización tanto la larva como el adulto farato se descongelan en agua destilada a temperatura ambiente y una vez descongelados se lavan dos veces con agua destilada. El material a utilizar se homogeneiza en tampón fosfato potásico 0.1 a pH 7.5 con mercapto etanol y

EDTA en las proporciones que se indican en los esquemas 1 y 2. La homogeneización se realiza en un OMNI-MIXER de aspas durante 9 minutos en períodos de 3 minutos.

2.3.2. OBTENCION DE LA FRACCION SOLUBLE

El homogeneizado, así obtenido, se centrifuga a continuación a 16,300 g durante 10 minutos en una centrífuga SORVALL RC2B refrigerada entre 2 y 4°C.

El precipitado se deshecha y el sobrenadante se centrifuga de nuevo a 95,000 g durante 90 minutos en una ultracentrífuga Beckman modelo L-4 clase Q con un rotor tipo 40.

Nuevamente se deshecha el precipitado y el sobrenadante se utiliza para las sucesivas etapas.

2.3.3. TRATAMIENTO CON SULFATO AMONICO

Esta etapa se realiza de dos formas diferentes.

Procedimiento A: Se utiliza una única concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este se añade lentamente y con una espátula a la fracción soluble obtenida en la etapa anterior, la cual se mantiene en agitación constante por medio de un agitador magnético.

Una vez alcanzada la concentración de sulfato amónico deseada se mantiene la agitación durante 30 minutos al cabo de los cuales se centrifuga la solución a 23,300 g durante 30 minutos.

El sobrenadante se deshecha y el precipitado se redisuelve en tampón fosfato 0.1 M manteniendo la suspensión durante un período de 40 minutos a 1 hora; transcurrido este tiempo se centrifuga a 23,300 g durante 30 minutos

utilizando el sobrenadante obtenido para la etapa siguiente de purificación.

Procedimiento B: La fracción soluble obtenida en la ultracentrifugación se precipita entre dos concentraciones de sulfato amónico, para lo cual se procede análogamente al caso anterior utilizando la concentración más baja de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Una vez realizada la centrifugación en Sorvall se despreja el precipitado y el sobrenadante se vuelve a tratar con la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que reste para alcanzar la concentración superior de éste, volviéndose a tener agitando unos 30 minutos, al cabo de los cuales se realiza una nueva centrifugación de 23,300 g. durante 30 minutos.

El precipitado de esta centrifugación se redissuelve en tampón fosfato 0.1 M y el sobrenadante obtenido de la centrifugación a 23,300 g durante 30 minutos se utiliza para la siguiente etapa de purificación.

2.3.4. DIALISIS Y TRATAMIENTO CON SULFATO DE PROTAMINA

La eliminación de los restos de sulfato amónico se lleva a cabo mediante diálisis frente a tampón fosfato de la misma concentración que la de la muestra.

Dicha diálisis se ha realizado en bolsas de diálisis dentro de un vaso con cinco litros de tampón fosfato durante una noche, en cámara fría, pero a la vista de la pérdida de actividad en función del tiempo de diálisis, se ha pasado a realizarla en un ultrafiltrador G/HFU-1 de acetato de celulosa de fibra hueca en cuyo interior permanece la solución a dializar, pasando por las fibras hue-

cas una corriente de tampón fresco que realiza la eliminación del sulfato amónico.

El tratamiento con sulfato de protamina se realiza para obviar la posible interferencia de ácidos nucleicos a lo largo de la purificación y que podrían competir con la Sintetasa (proteína ácida) en el posterior tratamiento con DEAE.

Después del tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, una solución al 1% de sulfato de protamina en tampón fosfato potásico a pH 7.5 se añade gota a gota y con agitación, hasta completar la cantidad de 0.12 mg de ésta por cada mg. de proteína, manteniéndose posteriormente la agitación durante 30 minutos. El precipitado producido se elimina por centrifugación a 23,300 g durante 15 minutos realizándose a continuación una diálisis como la anteriormente descrita.

2.3.5. TRATAMIENTO CON GEL DE FOSFATO CALCICO

Se utiliza para su preparación el método de Keilin y Hartree (177). Se diluyen 150 ml de una solución de cloruro cálcico (132 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ por litro) hasta 1,600 ml con agua destilada y se añaden 150 ml de una solución de fosfato trisódico (152 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ por litro) con pH 7.5-7.8 con ácido acético diluido al 10% (v/v).

El precipitado obtenido se lava varias veces por decantación con agua destilada realizándose finalmente un último lavado sobre embudo Buchner, guardándose a continuación el gel obtenido (disuelto en una pequeña cantidad de agua) a 4°C y en la oscuridad para lograr su "envejecimiento" durante períodos de tiempo de 6 meses.

La disolución obtenida del tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

se trata con cantidades variables de gel de fosfato cálcico en función de la cantidad de proteína presente procurando mantener la relación gel:proteína en la proporción 1:1.

Después de un contacto de 6 minutos se centrifuga la mezcla durante 10 minutos a 3,200 g.

El sobrenadante se elimina y el precipitado se trata con 30 ml de tampón fosfato 0.02 M pH 7.5, con el que se tiene en contacto 10 minutos y se recoge el sobrenadante.

El precipitado se vuelve a tratar con 20 ml del mismo tampón, con el que se tiene en contacto 10 minutos recogiendo el sobrenadante que se mezcla con el anterior.

2.3.6. PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA SOBRE DEAE-CELULOSA

La DEAE-celulosa (dietilamino etil-celulosa) utilizada es del tipo DE52 microgranulada Whatman.

Para su utilización se suspendió en tampón fosfato 0.01 M pH 3 renovándose el tampón hasta que la resina quedó a un pH aproximado de 4.5.

A continuación se elimina el aire y CO₂ poniendo la resina en un kitasato conectado a una trompa de vacío y con agitación constante con un agitador magnético durante 3 ó 4 horas al cabo de las cuales, y una vez eliminadas todas las burbujas, se llevó a pH 7.5 por sucesivos lavados con tampón fosfato 0.01 M.

A continuación, la resina ya está en condiciones de ser empaquetada, para lo cual se pone en la parte inferior de la columna un poco de tampón fosfato 0.01 a pH 7.5 y se añade la resina suspendida en tampón por la parte superior de la columna. La resina se deja sedimentar

espontáneamente con un flujo de tampón de 20 ml/hora.

Una vez empaquetada la columna ya está en condiciones para su posterior uso.

La disolución de proteína se pasa por la columna con un flujo de 20-25 ml/hora; la columna se lava seguidamente con tampón fosfato 0.01 M, pH 7.5, con lo que solo quedan retenidas las proteínas con afinidad por el DEAE.

La elución de las proteínas se puede realizar de dos formas: a) mediante gradiente continuo de tampón fosfato, pH 7.5, 0.01 M-0.7 M; b) mediante gradiente discontinuo de sucesivos tampones fosfato a diferentes concentraciones y recogiendo la proteína eluída a la concentración del tampón que nos interese.

La identificación de las sucesivas proteínas eluídas se realiza midiendo la absorbancia de los tubos de colector a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DB-G.

2.3.7. PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA SOBRE COLUMNA DE SE-PHADEX G-150

Sephadex G-150 se prepara por hinchamiento en un exceso de tampón fosfato 0.01 M durante tres días en presencia de hibitane al 0.002%.

A continuación se elimina el aire de la misma forma que se hizo para el DEAE-celulosa.

El empaquetamiento del Sephadex se realiza poniendo en la columna una pequeña cantidad de tampón fosfato 0.25 M y añadiendo a continuación el gel formado por la parte superior de la columna a la que se ha acoplado un embudo. Durante unos minutos se mantiene la columna cerrada hasta que el Sephadex se deposita 1-2 cm y permitiendo después

su sedimentación con un flujo de 5-6 ml/hora.

Una vez empaquetada la columna se equilibra con el tampón de elución, del cual se pasa un volumen equivalente a dos veces y media el volumen de la columna utilizando un flujo de 15-20 ml/hora.

Finalmente para comprobar el empaquetamiento se pasa azul de dextrano.

La disolución de proteínas obtenida después del tratamiento con DEAE-celulosa se pasa por la columna Sephadex llevando a cabo la elución con tampón fosfato 0.25 M, pH 7.5. La identificación de las proteínas eluidas se realiza como en el caso del DEAE-celulosa.

2.4. METODOS DE CONCENTRACION DE PROTEINAS

2.4.1. CONCENTRACION EN POLIVINIL PIRROLIDONA

Una bolsa de diálisis conteniendo la solución de proteína a concentrar se introduce en una solución muy concentrada de polivinil pirrolidona.

El agua tiende a atravesar la bolsa de diálisis para equilibrar la concentración de ambas soluciones con lo que la proteína se concentra.

Realizamos la operación en cámara fría (4°C) con agitación de la solución de polivinil pirrolidona.

2.4.2. CONCENTRACION CON SEPHADEX

Se han utilizado para este propósito Sephadex G-25, G-50 y G-75 "coarse" de límites de exclusión 5,000, 30,000 y 70,000 de peso molecular, respectivamente. Se añade Sephadex seco a la solución de proteína; el agua y las sus-

tancias de peso molecular inferior al límite de exclusión penetran en los granos de Sephadex permaneciendo en la solución externa las sustancias de alto peso molecular.

La operación se realiza en tubos de centrifuga introduducidos en baño de hielo; después de unos minutos se separa de la mezcla el gel por centrifugación quedando en el sobrenadante la solución concentrada de proteína.

2.4.3. CONCENTRACION EN LYPHOGEL

El fundamento es el mismo que en 2.4.2. siendo el límite de exclusión en este caso 20,000. El agua y las sustancias de bajo peso molecular se embeben en el lyphogel separándose fácilmente la solución externa con una pipeta Pasteur. El proceso es mas largo (1 g de lyphogel concentra 5 ml en 5 horas) y también en este caso se realiza la operación en baño de hielo.

El lyphogel utilizado se recupera fácilmente mediante sucesivos lavados con agua destilada secando a continuación en estufa a 60°C.

2.4.4. CONCENTRACION EN ULTRAFILTRADOR b/HFU-1

La solución a concentrar se coloca en el interior de la célula de ultrafiltración, tapándose sus dos salidas así como una de las dos salidas de la fibra hueca, cuya otra salida se conecta a una trompa de vacío, de esta forma el disolvente sale por dicha salida con lo que la solución se va concentrando paulatinamente.

2.4.5. CONCENTRACION CON CELULAS DE ULTRAFILTRACION AMICON

La solución a concentrar se pone en el interior de una

célula de ultrafiltración modelo UF52 de 60 ml de capacidad en cuyo fondo se pone una membrana de diálisis PM 10 de 43 mm. de diámetro.

Por la parte superior se pasa una corriente de N_2 , a una presión máxima de 3 atmósferas, con lo que se logra una concentración de la proteína desde un volumen inicial de 50 ml a 6 ml en un tiempo de aproximadamente dos horas.

La operación se realiza en cámara fría entre 6 y 10°C de temperatura.

2.5. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Se parte de 10 g de larva congelada que se disuelven en 40 ml de un tampón formado por sacarosa 0.25 M y TRIS 0.05 M, pH 7.4.

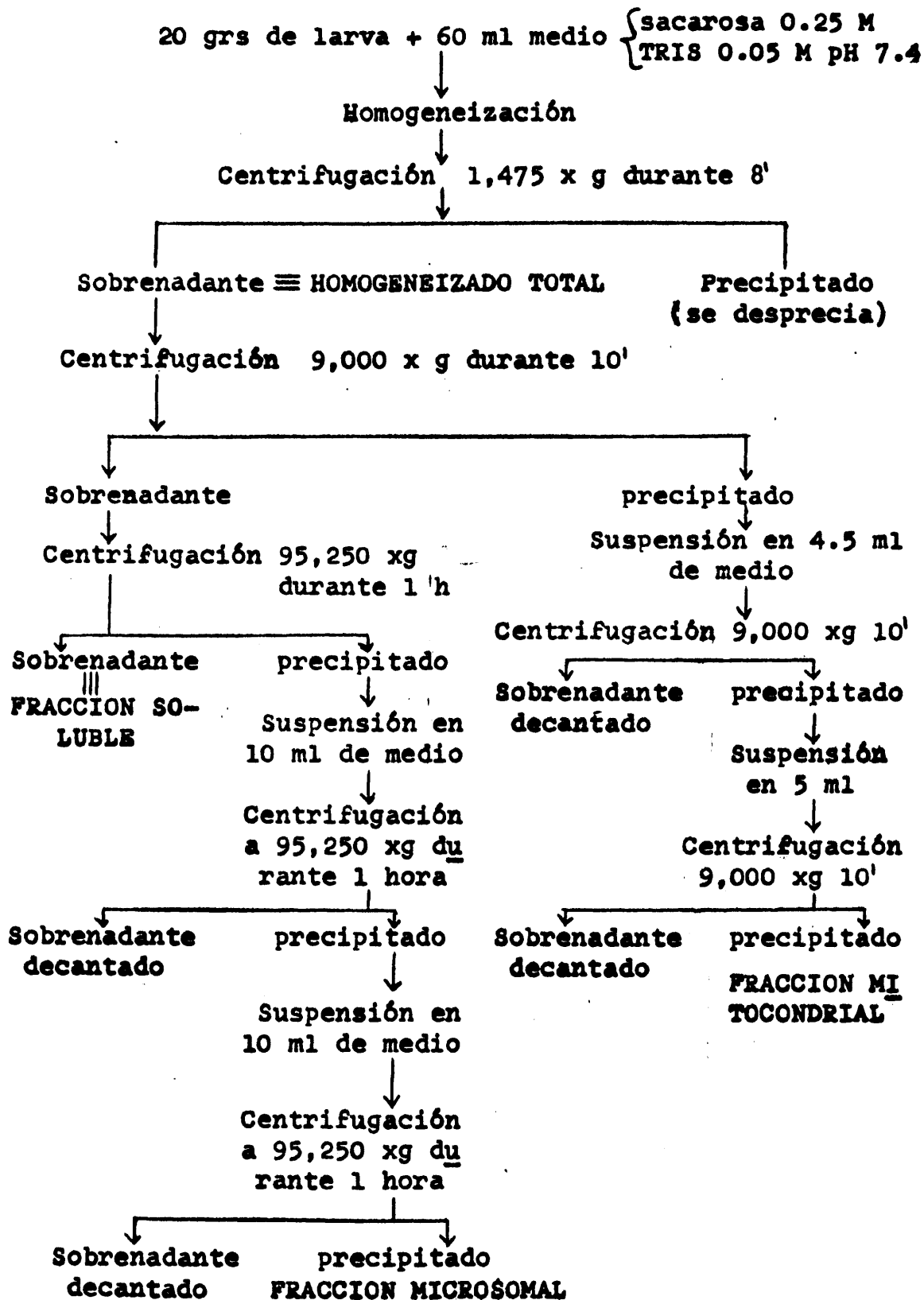
La homogeneización se realiza en un Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón.

El homogeneizado obtenido se filtra por tres capas de gasa y el filtrado se centrifuga 8 minutos a 1,475 g.

El precipitado se desprecia y el sobrenadante que se considera como homogeneizado total se centrifuga 10 minutos a 9,000 g, obteniéndose un sobrenadante S y un precipitado P.

El precipitado P se resuspende en 4.5 ml de medio de homogeneización y se centrifuga 10 minutos a 9,000 g eliminándose el sobrenadante y volviendo a resuspender el precipitado en 5 ml. Nuevamente se centrifuga 10 minutos a 9,000 g y el precipitado así obtenido es el que se usa como fracción mitocondrial una vez disuelto de forma que contenga la concentración de proteína deseada para el experimento a realizar.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR



El sobrenadante S se centrifuga 1 hora a 100,000 g obteniéndose un sobrenadante que consideraremos como fracción soluble y un precipitado que lavamos dos veces con 10 ml de tampón de homogeneización, centrifugando de nuevo a 100,000 g durante una hora.

Una vez realizados estos lavados, el precipitado obtenido lo consideramos como fracción microsomal. Para su utilización lo redisolveremos de forma que contenga la concentración de proteína deseada en el experimento a realizar.

La pureza de las fracciones obtenidas siguiendo este método de fraccionamiento se comprueba utilizando como enzimas marcadoras: glutámico deshidrogenasa para la fracción mitocondrial (189), glucosa-6-fosfatasa para la fracción microsomal (190) y láctico deshidrogenasa para la fracción soluble (191).

2.5.1. VALORACION DEL SISTEMA DE ELONGACION DE ACIDOS GRASOS EN MITOCONDRIAS

Se basa en la utilizada por Wit-Peeters (192).

La mezcla de incubación está formada por:

KCl	90 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	5 mM
NADH	1.5 mM
ATP	5 mM
Acetil-CoA	50 mM (0.1 μ Ci)
Fosfato potásico	0.1 M, pH 7.5

y fracción mitocondrial con una concentración de proteína de 0.2 mg/ml en un ml de incubación.

Se realiza la incubación a 37°C durante 30 minutos y se detiene con KOH al 50%.

El método de extracción de los ácidos grasos formados es el descrito en 2.8.3.2. La radiactividad se mide según 2.8.4.

2.6. VALORACION DE PROTEINAS

2.6.1. METODO DE LOWRY (193)

Reactivos:

Solución A : 2% Na_2CO_3 en 0.1 N de NaOH

Solución B : 0.5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 1% de tartrato só
dico potásico.

Reactivo Folin-Ciocalteu

Se prepara una mezcla de las soluciones A y B en proporción 50:1 en el momento de efectuar la valoración y se añaden 5 ml de esta mezcla a 1 ml de la solución problema cuyo contenido de proteína esté comprendido entre 150 y 900 γ/ml ó entre 10-100 γ/ml . Se agita la mezcla y se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos después de los cuales se añade a cada tubo 0.5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu con agitación inmediata y se deja la mezcla 40 minutos a temperatura ambiente. Aparece una coloración azul cuya absorbancia se mide a 500 nm para concentraciones entre 150-900 γ/ml y a 740 nm para concentraciones 10-100 γ/ml .

Como blanco en ambos casos se utiliza una mezcla igualmente preparada, sustituyendo la proteína con agua destilada.

El contenido de proteína se deduce a partir de curvas

patrón construídas con los datos de absorbancia de distintas concentraciones de albúmina dentro de los límites establecidos: a 740 nm 10-100 γ /ml

a 500 nm 150-900 γ /ml

En algunas etapas de purificación, el exceso de fosfato potásico produce la aparición de un precipitado blanco que se separa por centrifugación, realizando las medidas de absorbancia en el sobrenadante sin que aparentemente se altere la medida.

2.6.2. METODO DEL BIURET

A) Reactivos: (194)

- 4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de H_2O destilada añadiendo 2 ml de glicerina.

- 80 g de NaOH en 400 ml de agua destilada.

Se mezclan ambas soluciones y se lleva a un volumen final de 1 litro.

La muestra se mezcla con la solución de Biuret en las siguientes proporciones:

1 vol. de problema + 2 vol. de sol. Biuret → para muestras no coloreadas

1 vol. de problema + 5 vol. de sol. Biuret → para muestras coloreadas

Después de llevar a cabo la mezcla se tienen en contacto durante 10 minutos, al cabo de los cuales se mide su absorbancia a 540 nm.

B) Reactivos: (195)

1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y 6 g de tartrato sódico potásico en 500 ml de agua destilada. Se añade NaOH al 10% libre de

carbonatos (300 ml). Se añaden 2 g de KI para evitar la autoreducción. La solución se lleva a dos litros y se almacena en botella de polietileno.

Determinación de la proteína:

A 1 ml de la muestra que contiene 1-10 mg de proteína se añaden 4 ml del reactivo dejándose 30 minutos a temperatura ambiente. Se mide después absorbancia a 540-650 nm.

Interfieren en la medida las sales de amonio.

C) Microbiuret

Reactivos:

Se disuelven 173 g de citrato sódico y 100 g de carbonato sódico en agua caliente (no hirviendo). Se añaden 17.3 g de sulfato cúprico en 100 ml de agua destilada y la mezcla se lleva a 1 litro con agua destilada. Este es el reactivo de Benedict.

A la muestra que contiene de 0.1-2 mg de proteína disueltos en 4 ml de solución de NaOH al 3% se añaden 0.2 ml de reactivo y se miden absorbancias a 330 nm después de 15 minutos a temperatura ambiente.

2.6.3. METODO DE WARBURG Y CHRISTIAN (196)

Está basado en la comparación de densidades ópticas a 280 y 260 nm. Warburg y Christian han determinado la absorción a estas longitudes de onda de mezclas conocidas de proteínas y ácidos nucleicos y recopilando datos para la estimación de la cantidad de proteína deducible de es tos valores, con la condición de que el contenido en aci dos nucleicos no exceda del 20% del total.

Con objeto de evitar la necesidad del uso de tablas, Kalckar introduce la ecuación:

$$\text{Proteína (mg/ml)} = 1.45 \text{ DO}_{280} - 0.74 \text{ DO}_{260}$$

2.6.4. VALORACION DE PROTEINAS POR MEDIDA DE ABSORCION A 215-225 NM

Se efectuó por medida directa de absorbancias a 215, 220-225 nm donde se supone proporcionalidad para concentraciones entre 20-100 µg/ml.

Para la confección de rectas patrones se utilizaron distintas concentraciones de albúmina en el mismo tampón fosfato en el que van disueltas las muestras de proteínas a valorar.

2.7. VALORACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA

2.7.1. METODO ESPECTROFOTOMETRICO

La valoración se basa en la lectura de la disminución de absorbancia medida a 340 nm, debida a la desaparición de NADPH en el proceso de biosíntesis de novo de los ácidos grasos.

La mezcla de reacción es:

Fosfato potásico	0.25 M pH 7.5
Mercapto etanol	200 µM
EDTA	400 µM
Acetil-CoA	12 µM
NADPH	300 µM
Malonil-CoA	43 µM
Enzima	1-10 miliunidades
en un volumen final de 2 ml.	

Una miliunidad de enzima es la cantidad de ésta que ba

jo las condiciones del ensayo espectrofotométrico consume 1 μ mol de Malonil-CoA por minuto (correspondiente a 2 μ mol NADPH ó a un cambio de densidad óptica de 0.006).

En primer lugar se mide el descenso de la densidad óptica de un blanco construido por todos los elementos de la reacción a excepción de Malonil-CoA; después de 3-4 minutos se adiciona el sustrato (malonil-CoA) y se mide así el grado de oxidación total, al que habrá que restar el grado de oxidación del NADPH en el blanco.

2.7.2. METODO RADIATIVO

La actividad de ácido graso sintetasa fue ensayada por estudio de la incorporación de Acetil-CoA- 14 C en ácidos grasos.

La mezcla de incubación fue:

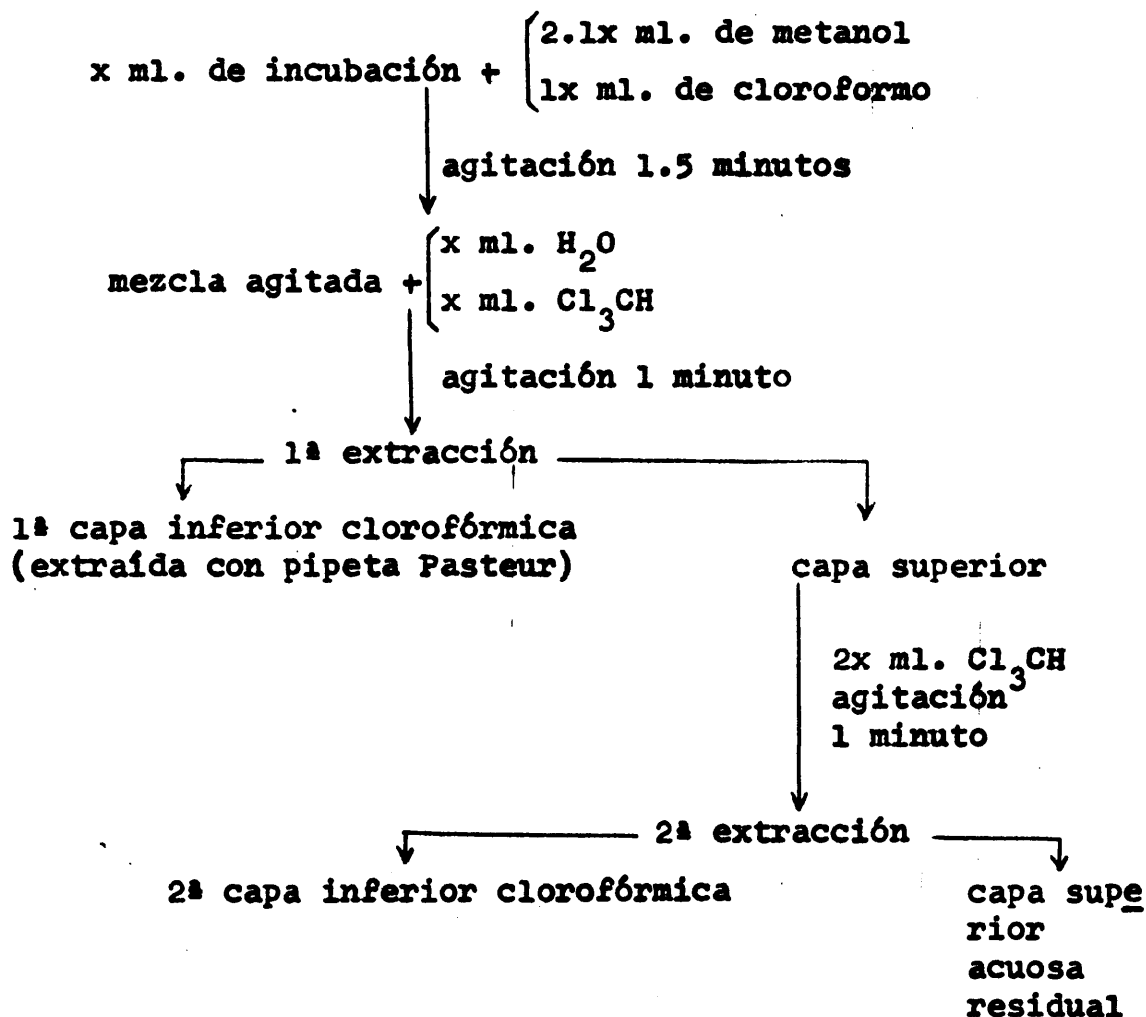
14 C Acetil-CoA	13.5 μ M (0.05 μ Ci/ml inc.)
Mercapto etanol	3 mM
EDTA	3 mM
Malonil-CoA	50 μ M
NADPH	300 μ M
Fosfato potásico	0.25 M
Proteína	0.3 ml. (concentraciones variables)
En un volumen total de 0.5 ml.	

La reacción se lleva a cabo en un baño de agua a 37°C con agitación constante durante 10 minutos, transcurridos los cuales se introducen los tubos en un baño de hielo y se detiene la reacción por adición de:

- 1.05 ml de metanol-0.5 ml de cloroformo si se va a llevar a cabo la extracción por el método de Bligh-Dyer.
- 0.15 ml de KOH 50% si se van a extraer los ácidos

grasos con hexano. (En este caso es necesario que la concentración de proteína sea inferior a 0.3 mg/ml incubación).

2.7.3.1. Extracción de ácidos grasos.- Método de Bligh-Dyer



Las dos capas clorofórmicas con los ácidos grasos se reúnen en un mismo tubo y se secan con SO₄Na₂ durante 12 horas en cámara fría (5°C). Se filtran por papel Whatman nº1 a viales de centelleo y se lleva a sequedad por evaporación del disolvente en estufa a 60°C.

Los viales se dejan enfriar y se añade líquido de cente

lleo y se determina la radiactividad de la muestra.

2.7.3.2. Extracción de Ácidos grasos. Método de extracción con hexano (163)

La reacción de formación de ácidos grasos se detiene por adición de 0.15 ml. de KOH al 50%. Se introducen a continuación los tubos durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo para que se produzca la hidrólisis de los enlaces tioester. Después de enfriada la mezcla se acidifica con HCl 6 N hasta viraje del indicador naranja de metilo y 3-4 gotas en exceso para asegurar un pH menor que 1. Se añaden 5 ml. de disolvente (eter de petróleo, eter etílico o hexano), se cierran los tubos con tapón de rosca y se agitan por vibración 2 veces durante 30 segundos. La fase acuosa se congela por introducción de los tubos en aire líquido y la fase orgánica se decanta a viales de centelleo. Se repite la operación de extracción una vez más y se elimina el disolvente del extracto de ácidos grasos en estufa a 60°C.

Cuando los viales están ya fríos se añade la solución de centelleo y se determina la radiactividad de la muestra.

La utilización de este método de extracción requiere que la proteína se encuentre a concentración inferior a 0.3 mg/ml incubación, ya que a niveles superiores la agitación de las fases acuosa-orgánica forma una especie de gel que impide continuar el proceso de extracción.

2.7.4. Medida de la radiactividad incorporada a los ácidos grasos

La radiactividad se determina por centelleo líquido usando como sistema de centelleo una mezcla de PPO (2.5-difeniloxazol), 4 g, de POPOP (1.4 bis 2-(5-feniloxazolil)benceno), 100 mg, en un litro de tolueno. A cada vial se añaden 10 ml de esta solución de centelleo.

Las medidas de radiactividad se efectúan en un espectrómetro de baja temperatura Unilux II, Nuclear Chicago.

2.8. CONTROL DEL GRADO DE PURIFICACION DE LA ENZIMA

2.8.1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se utilizó la técnica descrita por Davis (197).

Para ello se prepararon las siguientes soluciones para el gel inferior:

Solución 1 (monómero)	Acrilamida	28 g
	Bisacrilamida	0.75 g
	H ₂ O hasta	100 ml.

Solución 2 (tampón Temed)	Tris 3 M, pH 8.9 ajustado Temed 0.23%	Con ClH
---------------------------	--	---------

Solución 3 : persulfato amónico 0.14% (preparada en el momento de su utilización).

Todas éstas se preparan con H₂O tridestilada y se mantienen entre 3 y 6°C.

Para la formación de los geles, con un 7.5% de acrilamida, estas soluciones se mezclan en proporción: monómero/Tampón-Temed/H₂O tridestilada/persulfato amónico, 2/1/1/4 (v/v/v/v). De la mezcla resultante se extraen las burbujas de aire reduciendo la presión y agitando vigorosamente. Inmediatamente el gel se deposita en los tubos (5 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y 120

mm de longitud), y sobre la superficie se añade una pequeña cantidad de agua para evitar que se forme menisco al polimerizar. El agua debe añadirse con cuidado para no distorsionar la superficie del gel. Durante la polimerización, los tubos están tapados por el extremo inferior con gomas y dispuestos en gradillas verticalmente. La polimerización dura unos 20 minutos. Una vez terminada ésta se extrae la capa superior de agua con papel de filtro. A continuación se lleva a cabo la formación del gel superior, formado por las siguientes soluciones:

Solución monómero : Acrilamida 10 g

Bisacrilamida 2.5 g

H₂O hasta 100 ml.

Solución tampón-Temed : Tris ácido 5.98 g

Temed 0.46 ml

Ajuste de pH con HCl 1 N a 6.7

H₂O destilada hasta 100 ml.

Fotocatalizador : Riboflavina 4 g

H₂O destilada hasta 100 ml.

Las proporciones de mezcla, en volumen, son : (monómero/tampón/riboflavina) 2/1/1.

Se depositan en la oscuridad, ya que la polimerización del gel superior es catalizada por la luz, 50 µl de esta mezcla sobre el gel inferior. Se añade igual que antes una pequeña capa de agua y se procede a la polimerización de los geles bajo una lámpara fluorescente.

Cuando el gel superior ha polimerizado, los tubos con los geles se colocan en la cubeta de electroforesis y se extrae la capa de agua y se procede a cargar la muestra.

Composición del tampón.

El tampón que se dispone en las cámaras de los electrodos está compuesto por glicocola 0.037 M y Tris, ajustado a pH 8.3. Se suele preparar una solución madre diez veces mas concentrada que se diluye en el momento de su utilización. La solución que se incluye en ambas cámaras (superior e inferior) tiene la misma composición.

Aplicación de la muestra

La muestra se diluye en sacarosa al 40% y se aplican 0.6 mg en un volumen de 50 μ l sobre la superficie superior de cada gel, y después se añade tampón glicocola-Tris hasta completar el volumen del tubo, procurando que no se mezcle con la muestra. La cámara del tampón superior se llena con el mismo tampón hasta que quede sumergido el electrodo. Si se desea marcar el frente de migración, se añade Azul de bromofenol al 0.01%.

Condiciones de desarrollo

Al comenzar la electroforesis se gradúa el voltaje de forma que la intensidad de corriente sea de 4 mA por tubo, y 15 minutos después se corrige esta intensidad a 2.5 mA por tubo. El ánodo corresponde a la cubeta inferior y el cátodo a la superior. Las proteínas migran hacia el ánodo y el tiempo de desarrollo oscila alrededor de tres horas.

2.8.1.2. Métodos de revelado

Una vez terminada la electroforesis, los geles se sacan de los tubos inyectando agua destilada fría a presión entre la pared del tubo y el borde del gel, procurando no

dañarlo. Los geles se sumergen en H_2O destilada y después de lavados se introducen en la solución de tñido.

a) Azul de Coomassie. La solución tñido contiene:

1.25 g de azul de Coomassie, 454 ml de metanol al 50% y 64 ml de ácido acético glacial. De esta solución se separa el material insoluble filtrando sobre Whatman nº 1. Se mantienen los geles en la solución tñido de 2 a 10 horas. Se aclaran los geles con agua destilada y se sumergen en una solución de destñido que contiene: 75 ml de ácido acético glacial, 50 ml de metanol y 875 ml de H_2O destilada. Se destñen los geles por electroforesis durante 2 horas utilizando la solución de destñido y se almacenan en ácido acético al 7.5%.

b) Amido Schwarz. Se sumergen los geles en una solución de Amido Schwarz al 0.5% en acético al 7% durante varias horas al cabo de las cuales se lavan varias veces con acético al 7.5%. A continuación los geles se colocan entre dos tiras de algodón impregnadas de acético al 7.5% y se establece entre ellas una corriente de 80-100 mA, con lo que el exceso de colorante migra hacia el ánodo arrastrado por el acético y solo quedan tñidas las bandas de proteína. Para finalizar el destñido se pueden sumergir los geles en un baño de acético al 7.5%, manteniéndolos agitados durante varias horas.

c) Negro de Alizarina. La solución de tñido es al 0.5% en etanol al 30%. Para revelar los geles se ponen en etanol al 40% en un baño de glicerina al 60%.

2.9. DETERMINACION DE PROPIEDADES BIOQUIMICO-FISICAS DE LA ENZIMA

2.9.1. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

2.9.1.1. Por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Se preparan soluciones de monómero mezclando a) 22.2 g de acrilamida y 0.37 g de bisacrilamida hasta 100 ml de H_2O destilada (relación bisacrilamida/acrilamida 1/60) y b) 22.2 g de acrilamida y 0.6 g de bisacrilamida hasta 100 ml de H_2O destilada (relación bisacrilamida/acrilamida 1/37).

Los geles se preparan mezclando:

10.1 ml de solución monómero para geles con 7.5% de acrilamida (ó 6.7 ml para un 5% de acrilamida), 10.8 de urea, 15 mg de SDS, 50 μ l de N, N, N', N', tetrametil etilen diamina, 1.25 ml de tampón fosfato 1.0 M, pH 7.6. Se ajusta el pH a 7.6 con HCl 1N. Se filtra y se añade H_2O hasta 30 ml. Se agregan 6 mg de persulfato sódico para catalizar la polimerización.

Una vez llenas las 4/5 partes de los tubos de electroforesis (10 x 0.6 cm), se deposita en la parte superior del gel una pequeña capa de H_2O , y la polimerización se completa en 30 minutos. Se dejan reposar los geles durante una hora.

Las muestras se disuelven en tampón fosfato ($HNa_2PO_4 \cdot H_2O$ y $H_2NaPO_4 \cdot H_2O$) 0.01 M pH 7.6, urea 8.0 M y SDS 0.05%, de manera que la concentración sea de 1 mg/ml; aplicándose 20-25 μ l de la muestra a cada gel.

El desarrollo electroforético se realizó en cubetas conteniendo tampón fosfato 0.025 M pH 7.6 y SDS 0.05% a 80 voltios y a tiempos variables según la experiencia.

Una vez acabada la electroforesis los geles se sacan por inyección de H₂O destilada entre la pared del gel y el vidrio y se tiñen con Azul de Coomassie (1.25 g de Azul de Coomassie, 454 ml de metanol al 50% y 46 ml de ácido acético glacial) durante una noche.

Se destiñen los geles entre algodones impregnados con ácido acético al 7.5%, durante 30 minutos y se introducen en una solución desteñido (50 ml de metanol, 75 ml de ácido acético, 875 ml de agua destilada).

Las proteínas patrones usadas fueron:

		nº de sub unidades	M sub.
Citocromo c	12,500 daltons.		
Lisozima	14,300		
Tripsina	23,300		
Pepsina	35,000		
Avidina	68,000		
Albúmina de suero de caballo	68,000		
Fosfatasa alcalina	80,000	2	40,000
α -amilasa	97,600	2	48,200
Piruvico quinasa	237,000	4	57,400
Ureasa	483,000	6	83,000
Ferritina	540,000	-	-
Tiroglobulina	669,000	2	335,000

Una vez desteñidos los geles se densitometran en un Microdensitómetro Canalco, modelo G, equipado con un computador para el registro automático de las áreas de los

picos. El máximo de cada uno de estos picos se utiliza como referencia de la distancia recorrida por la proteína en el gel.

El peso molecular se calcula representando movilidades frente al logaritmo del peso molecular. La movilidad se expresa en cm y es la distancia desde el origen del gel al máximo de la banda.

2.9.1.2. Cromatografía en Sephadex G-200

Dicha cromatografía se lleva a cabo en columnas de dimensiones 100 x 1.5 cm.

El gel utilizado para rellenar la columna es Sephadex G-200 cuyo rango de fraccionamiento va desde 5,000 a 800,000 daltons para péptidos y proteínas globulares.

Para trazar la curva patrón, con la que determinaremos el peso molecular problema, se utilizaron las siguientes proteínas:

<u>Proteína</u>	<u>Peso molecular (daltons)</u>
Arginina descarboxilasa	850,000
Tiroglobulina	669,000
Ferritina	540,000
Glutamato Deshidrogenasa	510,000
Fosforilasa A	330,000
Catalasa	240,000
Aldolasa	158,000
Albúmina	67,000
Albúmina	45,000
Pepsina	35,000
Quimiotripsinógeno A	25,000
Citocromo c	12,500

La cantidad de Sephadex G-200 necesaria para rellenar la columna se hincha durante cinco días en tampón fosfato 0.01 M, pH 7.5, al 0.002% en hibitane.

Una vez empaquetada la columna se equilibra con el tampón de elución, del cual se pasa un volumen equivalente dos veces y media el volumen de la columna. El flujo utilizado es de 6 ml/hora.

Finalmente se pasa azul de dextrano para comprobar el grado de empaquetamiento.

Las proteínas se van pasando una a una, recogiendo fracciones de 4 ml que se ensayan espectrofotométricamente.

Para calcular el peso molecular se representa logaritmos del peso molecular frente a su volumen de elución en la columna.

2.9.2. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINA

2.9.2.1. Análisis de aminoácidos

0.4 mg de proteína se precipitan con tricloroacético al 10% dándose al precipitado un lavado con el mismo líquido, realizándose a continuación una hidrólisis a 105°C durante 20 horas en tubo cerrado con 0.4 ml de HCl 5.7 N.

El resultado de la hidrólisis se lleva a sequedad a vacío en un desecador que contiene sosa, realizando dos lavados con agua para eliminar los restos de HCl que hayan podido quedar en el hidrolizado.

El hidrolizado una vez lavado se disuelve en el tampón A.

Los análisis de los hidrolizados se realizan en un analizador automático, modelo D-500 de la casa Durrum, do

tado de un computador PDP-8M que automatiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado. El aparato puede analizar muestras de 10 nmoles de hidrolizado. El tiempo de análisis es de 100 minutos. La resina y reactivo de minhidrina para la identificación de los aminoácidos se obtienen de la casa Durrum. Una vez retenida la muestra de aminoácidos a la resina se eluyen éstos con 3 tampones B, C y D sucesivamente cuya composición se describe a continuación.

TAMPONES DE CITRATO SODICO PARA ANALISIS DE
HIDROLIZADOS EN UNA UNICA COLUMNA

	A	B	C	D
pH	2.20±0.01	3.25±0.01	4.35±0.01	7.40±0.03
Concentración de sodio	0.20 N	0.20 N	0.20 N	1.10 N
Citrato sódico. 2H ₂ O	19.61 g	19.61 g	19.61 g	39.22 g
Cloruro sódico	—	—	—	40.90 g
Tiodiglicol	20.00 ml	5.00 ml	5.00 ml	—
ClH concentrado	16.50 ml	12.31 ml	8.37 ml	0.3 ml
Fenol	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Volumen final	1.00 l.	1.00 l.	1.00 l.	1.00 l.

Los tampones deben ser esterilizados y pasados por un filtro de 0.45 micras. El fenol es grado reactivo y el citrato sódico está libre de amoniaco.

Para regenerar la columna de resina después de cada análisis se utiliza una solución de sosa 0.3 N que contiene 0.25 g de EDTA por litro.

2.9.2.2. Valoración de triptofano

Se valoró por dos métodos espectrofotométricos diferentes.

En el primero de ellos (178) se aplica la fórmula:

$$\frac{M_{\text{tyr}}}{M_{\text{tryp}}} = \frac{0.592 A_{294.4} - 0.263 A_{280.0}}{0.263 A_{280.0} - 0.170 A_{294.4}}$$

donde M_{tyr} y M_{tryp} son los moles gramo de tyr y tryp en un gramo de proteína.

Las medidas se realizan con una concentración de proteína de 1 mg/ml en NaOH 0.1 N.

En el segundo (179), una muestra de proteína liofilizada se disuelve en cloruro de guanidinio 6 M a pH 6.5 en una concentración de 1 mg/ml midiéndose absorbancias a 280 y 288 nm.

El nº de moles de triptófano se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{moles de tryp} = \frac{A_{288}}{3103} - \frac{A_{280}}{10,318}$$

2.9.3. PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE LA ENZIMA

2.9.3.1. FMN

La presencia de nucleótidos de flavina se investigó espectrofotométricamente según el método de Britton Chance (185) mediante aplicación de la fórmula:

$$A = \epsilon c l$$

donde A es la diferencia de absorbancia entre las obtenidas a 510 y 465 nm, ϵ vale $11 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ y $l = 1 \text{ cm}$.

2.9.3.2. Identificación de 4-fosfo-panteteína

Una vez realizada la precipitación total de la proteína (unos 10 mg) con TCA se centrifugó la mezcla y se dividió el precipitado en dos fracciones iguales. A cada una de ellas se le aplicó uno de los tratamientos siguientes:

Método a) Se mezclan 0.95 ml de ácido perbórmico al 98% con 5 ml de H_2O_2 al 30% (100 vol) y se incuban 2 horas a 25°C. Al cabo de ese tiempo 0.5 ml de este reactivo se añadieron al precipitado proteico y se mantuvieron en contacto 4 horas a 0°C; la reacción se detiene por dilución con 5 ml de H_2O y a continuación se liofiliza la solución.

Método b) En el 2º tratamiento se añadieron al precipititado proteico 0.2 ml de ácido fórmico al 88% con 0.025 ml de H_2O_2 al 30% los cuales se mantuvieron en contacto a 4°C durante 16 horas. La reacción se detuvo por dilución con 5 ml de H_2O y se procedió a liofilizar el producto de reacción.

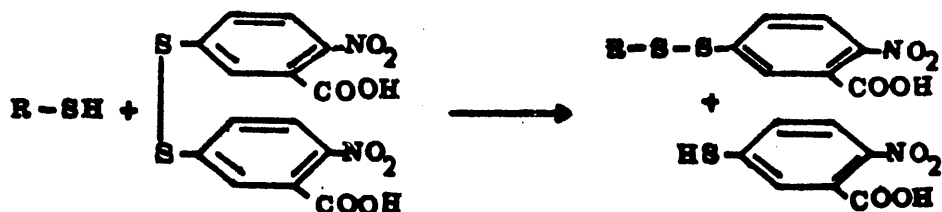
Los liofilizados obtenidos por ambos procedimientos se sometieron a una hidrólisis de aminoácidos y posterior identificación de éstos según se ha descrito en 2.9.2.1 identificándose β alanina (que resulta de la oxidación de la 4'-fosfopanteteína) como aminoácido adicional a los anteriores obtenidos en un análisis de aminoácidos normal.

2.9.3.3. Valoración de grupos SH

Se realizó por el método de Ellman (198).

Para ello se preparó una disolución 0.001 M de ácido 5.5'- Ditiobis (2- nitrobenzoico) (DTNB) disuelto en tampón fosfato potásico 0.1 M a pH 7.5.

A 0.9 ml de solución preteica de concentración variable (10-15 μ moles de grupos SH) se añaden 0.1 ml del anterior reactivo; la mezcla se agita y se mide la absorbancia producida por la formación de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico.



El coeficiente de extinción del DTNB reducido es 13,600.

Para calcular el nº de grupos -SH se realiza una recta patrón con concentraciones conocidas de cisteína entre 10 y 50 μ moles.

Una variación de 0.136 unidades de absorbancia corresponde a la presencia de 10 μ moles de grupos -SH en la disolución.

2.10. TERMINALIZACION DE CADENA

2.10.1. INCORPORACION DE ACETIL-CoA-¹⁴C A ACIDOS GRASOS

El método es básicamente igual al de valoración de Acido Graso Sintetasa, con las siguientes modificaciones:

-Se aumenta la cantidad de Acetil-CoA-1¹⁴C para conseguir suficiente incorporación radiactiva en las muestras para su posterior análisis (cantidades variables según el experimento).

-Variaciones en la cantidad de Malonil-CoA para estudiar su posible influencia en el esquema de ácidos grasos formados.

Una vez realizada la incubación (10 minutos a 37°C) se extraen los lípidos por el método de Bligh-Dyer. Una alícuota del extracto lipídico se utiliza para el control de incorporación isotópica total y el resto se destina al análisis de la incorporación en ácidos grasos previa formación de los ésteres metílicos.

2.10.2. PREPARACION DE LOS ESTERES METILICOS

Los ácidos grasos totales se convierten en sus ésteres metílicos por metanolisis (transesterificación) con el reactivo BF_3 -metanol (180).

Preparación del reactivo

En un recipiente de dos bocas introducido en un baño de hielo se pone metanol absoluto a través del que se hace pasar una corriente de BF_3 agitando continuamente, hasta que la cantidad de gas adicionado sea de 125 g. La operación dura alrededor de 1 hora. El reactivo guardado a -20°C es estable varios meses.

Formación de ésteres metílicos

Los lípidos totales disueltos en cloroformo se disponen en tubos de hidrólisis. El disolvente se evapora con N_2 y se añaden por cada mg de lípidos 0.3 ml de una mezcla formada por BF_3 -metanol, metanol absoluto y benceno (10/10/9) (v/v/v). Se cierran los tubos a la llama y se calientan en estufa 90 minutos a 100-110°C.

Extracción de los ésteres metílicos

A la solución de ésteres metílicos se adicionan 2 volúmenes de hexano y un volumen de agua; se agita por vibración y se extrae la capa superior de hexano. Se repite

dos veces más la extracción añadiendo cada vez dos volúmenes de hexano sobre la fase acuosa y los extractos reunidos se secan sobre sulfato sódico anhidro. Una vez filtrada se concentra la disolución en rotavapor hasta un volumen pequeño; se transvasa dicha disolución a tubitos de fondo cónico y se evapora a sequedad bajo N_2 . Estas mezclas de ésteres metílicos se conservan a $-20^{\circ}C$ y se emplean para el control radiocromatográfico.

2.10.3. RADIOCROMATOGRAFIA DE GASES. ANALISIS DE LOS ACIDOS GRASOS INDIVIDUALES

La separación e identificación de los ésteres metílicos se efectúa por cromatografía de gases en un cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo F20FE con detector de ionización de llama, equipado con una columna de acero inoxidable (1.83 m por 0.31 cm), rellena con 10% de EGS sobre Chromosorb W (60-80 mallas). Como gas portador se utiliza He con un flujo de 18.3 ml/min y la temperatura se mantiene a $180^{\circ}C$.

La radiactividad de los ésteres metílicos se determina a la salida de la columna por medio de reactor de flujo continuo/contador proporcional Perkin-Elmer modelo RGC 170, conectado a la unidad cromatográfica por medio de un divisor de flujo (relación de caudales 16:1). La corriente efluyente principal pasa a través del reactor de flujo continuo donde los ésteres metílicos se degradan por oxidación a CO_2 y agua. Esta última se elimina al hacer pasar los gases de la reacción de oxidación por un tubo de desecación, al final del cual se introduce una corriente continua de metano, por medio de una pieza T, de modo que se

produzca una relación He/metano 1:3. El tubo de conteaje tiene un volumen activo de 10 ml y opera a 2700 V. Las temperaturas de las distintas partes del equipo han sido: contador proporcional, 100°; horno de reacción, 620°; tubo de conexión entre el divisor de flujo y el horno, 200°.

La corriente menor, a la salida del divisor de flujo, se encamina directamente al detector de ionización de llama. Las señales producidas por el detector de ionización de llama y la del contador proporcional, se recogen sobre un mismo registro de doble canal que produce dos gráficas superpuestas, la cromatográfica y la de radiactividad. Estas dos gráficas tienen un desfase de aproximadamente 0.5 minutos, correspondiente al tiempo necesario desde la salida del divisor de flujo hasta el contador proporcional. Esto permite hacer corresponder perfectamente cada ácido graso identificado con su señal de radiactividad.

Las actividades relativas se determinan dividiendo el número de cuentas bajo un pico dado por el tiempo medio de residencia de cada componente en el volumen activo del contador proporcional, después de corregir la actividad de fondo. Las actividades específicas de cada componente se expresan convencionalmente como cpm/unidad de área del pico masa.

2.10.4. VALORACION DE ACIL-CoA

Se realiza mediante una incubación en condiciones análogas a las valoraciones de Acido Graso Sintetasa pero aumentando la cantidad de Acetil-CoA 1-¹⁴C para poder detectar niveles de acil-CoA formados que serán muy inferiores a los de los ácidos grasos libres.

La reacción (0.5 ml incubados 10 minutos a 37°C con 135 μ M Acetil-CoA- 14 C 0.25 μ Ci) se detiene por adición de 1.5 ml de H₂SO₄ 1 N.

Se realizan cinco tratamientos con 2 ml de éter (2 minutos de agitación) con lo que se extraen los ácidos grasos libres y posteriormente dos nuevas extracciones con cloroformo (1 ml, 1 minuto de agitación) donde se extraen los acil-CoA.

Los cinco extractos reunidos de ácidos grasos libres, y, por otra parte, los dos de acil-CoA se llevan a viales de centelleo, se elimina el disolvente en estufa a -60°C y, una vez fríos, se les añade la solución de centelleo y se determina la radiactividad incorporada.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. EXPERIENCIAS PRELIMINARES

Antes de proceder al aislamiento de la Acido Graso Sintetasa se han realizado una serie de experimentos para confirmar la presencia en larva de 6 días del mecanismo de biosíntesis catalizado por este sistema.

3.1.1. ACTIVIDAD DE LA ACETIL CoA CARBOXILASA Y BIOSINTESIS TOTAL DE ACIDOS GRASOS A LO LARGO DEL DESARROLLO

La primera serie de experiencias realizadas consiste en la valoración de la actividad de la Acetil-CoA Carboxilasa y de la biosíntesis total de ácidos grasos a lo largo del desarrollo del insecto (138).

La vinculación estrecha de la acetil-CoA carboxilasa con el sistema de ácido graso sintetasa en el seno de la biosíntesis de los ácidos grasos, justifica la detección cuantitativa conjunta de ambas actividades.

Los resultados obtenidos aparecen en las figuras 3 y 4 donde puede observarse que la biosíntesis de malonil-CoA aumenta extraordinariamente durante el desarrollo larvario alcanzando un máximo de actividad en el tercer estado de dicho desarrollo para disminuir a continuación progresivamente. No se detecta biosíntesis de malonil-CoA durante el estado de adulto farato, reapareciendo la actividad enzimática de nuevo después de la emergencia del insecto, que se incrementa de manera lenta y constante con la edad del insecto.

Por lo que se refiere a la síntesis total de ácidos grasos se aprecia un considerable incremento en el 4º es-

tado de larva (6 días de edad) y otro aumento de biosíntesis en la fase de adulto farato ya cercano a la emergencia. El pronunciado máximo de actividad que aparece durante el estado de larva puede correlacionarse fácilmente con el que también se observa en la Acetil-CoA Carboxilasa, si bien el máximo de esta segunda actividad exhibe un pequeño desplazamiento, lo que parece lógico dado que la malonil-CoA producida por ésta es uno de los sustratos de la ulterior actuación de la Acido Graso Sintetasa.

En las proximidades de la emergencia del adulto no aparece actividad significativa de Acetil-CoA Carboxilasa por lo que la incorporación isotópica total en ácidos grasos no puede relacionarse con un mecanismo de biosíntesis "de novo". Ello estaría, sin embargo, de acuerdo con la hipótesis anteriormente apuntada de un mecanismo de elongación mitocondrial.

3.1.2. ESTUDIOS SOBRE LA NATURALEZA ADAPTATIVA DE LA ACIDO GRASO SINTETASA EN LARVA

Otra serie de experiencias sobre la influencia del estado nutritivo del insecto -ayuno y realimentación- (174) da lugar a los resultados que aparecen en la figura 5.

Un ayuno de 4 a 6 horas suprime la síntesis de ácidos grasos en el insecto de una forma rápida. Cuando 24 horas después se realimenta la larva, un período de 4 horas es suficiente para estimular de nuevo la actividad enzimática alcanzándose los máximos valores de ésta 8 horas después de la realimentación a pesar de tratarse de un momento del estado larvario en que la biosíntesis es ya muy baja.

Los valores más altos de actividad enzimática para la larva realimentada corresponden a la dieta normal, siendo la dieta rica en ácidos grasos la que da la respuesta adaptativa más pequeña.

Cambios de este tipo se han apreciado en la actividad de la Acido Graso Sintetasa de hígado de mamíferos y de aves en función del estado nutricional del animal (158, 161, 166). Este tipo de variaciones también se ha observado a lo largo del desarrollo del hígado y cerebro de rata (95, 165), hígado de ratón (96) y de pollo (166) en los que la actividad de la enzima aumenta extraordinariamente en el hígado al destete del ratón o la rata o a la eclosión del pollo, al pasar de una dieta rica en grasa a otra de bajo contenido en grasa debido a la aceleración de la síntesis de la enzima. Ello está también de acuerdo con los valores obtenidos en la figura 5 donde la larva, que tiene una alimentación exógena respondería principalmente a unos patrones de biosíntesis "de novo" mientras que el adulto farato que se encuentra en un estado de aislamiento respecto al exterior usaría principalmente un mecanismo de elongación.

Un caso similar al de pupa de sistema metabólico cerrado podemos encontrarlo en embriones de pollo y asimismo, en cierta medida, en fetos de mamíferos. En el primer caso (173) la actividad de Acido Graso Sintetasa es muy baja en dicho estado frente a los valores alcanzados una vez alimentado el pollo, mientras que la elongación mitocondrial mantiene sus valores normales en ambos estados. En el segundo caso (175) se ha podido observar la ausencia de mecanismo de biosíntesis "de novo" en feto, siendo

sin embargo el mecanismo predominante en adultos.

3.2. VALORACION DE LA ACIDO GRASO SINTETASA

Utilizando como referencia el método de valoración usado en hígado de rata (142) y teniendo en cuenta que las condiciones experimentales pueden variar de unas especies a otras, se ha puesto a punto un método de valoración de Acido Graso Sintetasa variando concentraciones de cofactores, tiempo de incubación, concentración de tampón fosfato y pH del medio. La preparación enzimática utilizada es la obtenida después de centrifugar a 5,000 x g durante 10 minutos.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

3.2.1. PRESENCIA DE COFACTORES EN EL MEDIO DE INCUBACION:

TABLA I

<u>nMoles/ml</u> <u>Acetil-CoA</u>	<u>nmoles/ml</u> <u>malonil-CoA</u>	<u>nmoles de</u> <u>ácido graso formado</u>
2.5	12.5	0.190
2.5	25.0	0.363
2.5	50.0	0.468
2.5	75.0	0.530
5.0	12.5	0.243
5.0	25.0	0.387
5.0	50.0	0.563
5.0	75.0	0.650
12.5	12.5	0.417
12.5	25.0	0.531
12.5	50.0	0.750
12.5	75.0	0.990

La mezcla de incubación es, en umoles/ml, EDTA 4.2, mercapto-etanol 3.6, NADPH 0.3, fosfato potásico 250 (pH 7.5), cantidades variables de malonil-CoA y Acetil-CoA 1^{14}C (0.025 μCi) y 10 mg de proteína en un volumen total de 0.5 ml. La incubación se realizó a 37°C durante 30 minutos.

De los resultados obtenidos (Tabla I, fig. 6) se eligieron como concentraciones suficientemente óptimas de acetil-CoA y de malonil-CoA 12.5 y 50 nmoles/ml, respectivamente. Estas concentraciones, junto con las indicadas en la Tabla I, serán las utilizadas en las siguientes tablas cuando se hable de condiciones estandar.

3.2.2. TIEMPO DE INCUBACION

TABLA II

<u>Tiempos de incubación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
5 minutos	0.531
10 "	0.574
20 "	0.566
30 "	0.536

Mezcla de incubación estandar.

El tiempo de incubación (Tabla II, fig. 7) no parece influir mucho, dentro de los límites experimentados, en la formación de ácidos grasos. Se toma como tiempo de incubación en condiciones estandar 10 minutos.

3.2.3. CONCENTRACION DE PROTEINAS

TABLA III

<u>Concentración de proteína mg/ml de incubación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
2.6	0.771
5.2	0.546
7.8	0.403
10.4	0.273
13.0	0.213
15.6	0.228

Mezcla de incubación estandar. Varía la concentración de proteína.

Como puede verse (Tabla III, fig. 8) la actividad enzimática disminuye al aumentar la concentración de proteínas. Esto puede deberse a una competencia por la acetil-CoA entre la Acido Graso Sintetasa y otros sistemas enzimáticos presentes en el homogeneizado crudo y que viene favorecida hacia éstos últimos al aumentar la concentración de proteína.

Cuando se repite este experimento utilizando enzima purificada (3.8.3.2.) se ve una proporcionalidad entre concentración de proteína e incorporación de acetil-CoA en ácidos grasos.

Para obtener resultados comparativos entre diferentes experiencias se utilizó siempre la misma concentración de proteína.

3.2.4. FUERZA IONICA DEL MEDIO DE INCUBACION

TABLA IV

<u>Concentración de fosfato µmoles/ml incubación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
10	0.375
20	0.708
50	0.770
100	0.810
200	0.845
300	0.828

Mezcla de incubación estandar. Varía concentración fosfato.

Entre 100 y 300 µmoles/ml la actividad enzimática es la misma (Tabla IV, fig. 9).

3.2.5. INFLUENCIA DEL PH DE INCUBACION

TABLA V

<u>pH de incubación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
6.5	0.084
6.8	0.102
7.1	0.120
7.4	0.125
7.7	0.108
8.0	0.084

Mezcla de incubación estandar. Varía pH.

De estos resultados (Tabla V, fig. 10) puede deducirse que el pH al que la enzima exhibe su máximo de actividad en homogeneizado crudo se sitúa en las proximidades de 7.4 por lo que seguimos utilizando el de 7.5 que inicialmente se había elegido. Esta elección se había basado en los resultados de formación de ácidos grasos obtenidos con homogeneizado crudo de larva utilizando como precursor radiactivo acetato ^{14}C .

De todos los experimentos anteriormente indicados se concluyen unas condiciones de incubación para la valoración de actividad de la Acido Graso Sintetasa que se utilizará como MEZCLA DE INCUBACION ESTANDAR. Dicha mezcla está formada por:

EDTA	4.2 umoles/ml de incubación
mercapto etanol	3.6 " "
NADPH	0.3 " "
fosfato potásico	0.25 M (pH 7.5)
Acetil-CoA	12.5 nmoles/ml de incubación (0.025 μCi)
Malonil-CoA	50 nmoles/ml de incubación
Proteínas	10 mg
Incubación a 37°C durante 10 minutos.	

3.3. LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN DISTINTOS MOMENTOS DEL DESARROLLO

Una vez puesto a punto un método de valoración de la actividad de la Acido Graso Sintetasa se procede a su utilización en larva de 6 días y adulto farato de 5 y 8 días. Estos tres momentos del desarrollo son representa-

tivos de las diferentes situaciones de biosíntesis de ácidos grasos que pueden aparecer en ambos estados de larva y adulto farato. Como ya se ha visto anteriormente, la larva de 6 días corresponde a un máximo de biosíntesis de ácidos grasos mientras que el adulto farato de 5 días no presenta casi actividad de biosíntesis y el adulto farato de 8 días vuelve a presentar un máximo de actividad.

La valoración se realiza en homogeneizados totales y en fracciones subcelulares (mitocondrial, microsomal y soluble) para además de conocer la existencia del sistema de biosíntesis de novo, comprobar su localización celular.

TABLA VI

	<u>Larva 6 días</u>	<u>adulto farato</u>	
		<u>5 días</u>	<u>8 días</u>
Homogeneizado total	0.860	0.007	0.036
F. mitocondrial	0.050	0.007	0.005
F. microsomal 1º lavado	0.388	-	-
F. microsomal 2º lavado	0.168	-	-
F. microsomal	0.143	0.006	0.008
F. soluble	1.821	0.012	0.041

Los resultados están dados en nmoles de ácidos grasos formados. La concentración de proteína utilizada fue la misma en todas las valoraciones.

De los resultados obtenidos puede deducirse que la biosíntesis "de novo" ocurre solo en el estado de larva, no produciéndose en adulto farato. Dicha capacidad de biosíntesis está localizada en la fracción soluble dado que des

pués de dos lavados de la fracción microsomal la actividad remanente en ésta es de un 8%.

Como comprobación de la hipótesis recogida en la introducción se procedió a la puesta a punto de un método de valoración de síntesis de ácidos grasos en mitocondrias; dicho método se utilizó en la evaluación de la fracción mitocondrial de larva de 6 días y adulto farato de 8 días.

TABLA VII

<u>Larva de 6 días</u>	<u>mg prot/ml</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>	
		<u>Sistema I</u>	<u>Sistema II</u>
Mitocondrias intactas	11.2	1.144	1.250
Mitocondrias rotas	12.1	1.185	1.427
<u>Adulto farato 8 días</u>			
Mitocondrias intactas	10.75	0.543	0.645
Mitocondrias rotas	11.0	0.535	0.648

El sistema de incubación utilizado es el descrito en materiales y métodos (2.5.1.).

Las valoraciones están realizadas con 0.25 mg de proteína.

Por lo tanto queda demostrado que en larva de 6 días tiene lugar tanto la biosíntesis "de novo" como la elongación mitocondrial, mientras que en adulto farato de 8 días no se produce biosíntesis de novo pudiendo ser la mitocondrial la responsable del máximo de actividad que aparece en dicho estado de desarrollo.

3.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA ACIDO GRASO SINTE- TASA DE LARVA DE 6 DIAS

Para proceder a dicho aislamiento usamos como esquema inicial el utilizado para hígado de rata por Hsu (142).

Como iremos viendo a continuación cada una de dichas etapas se somete a una revisión experimental utilizando finalmente el esquema de aislamiento que se ha encontrado más idóneo para el sistema enzimático procedente del insecto.

3.4.1. OBTENCION DE FRACCION SOLUBLE

El homogeneizado inicial (150 g larva/75 ml de tampón fosfato 0.1 M, 5 mM EDTA, pH 7.5), se somete a una primera centrifugación a 34,800 g durante 15 minutos para la eliminación de restos celulares. El sobrenadante, dividido en 4 fracciones iguales, se somete a distintas condiciones de centrifugación, valorándose posteriormente cantidad de proteína obtenida y actividad de Acido Graso Sintetasa.

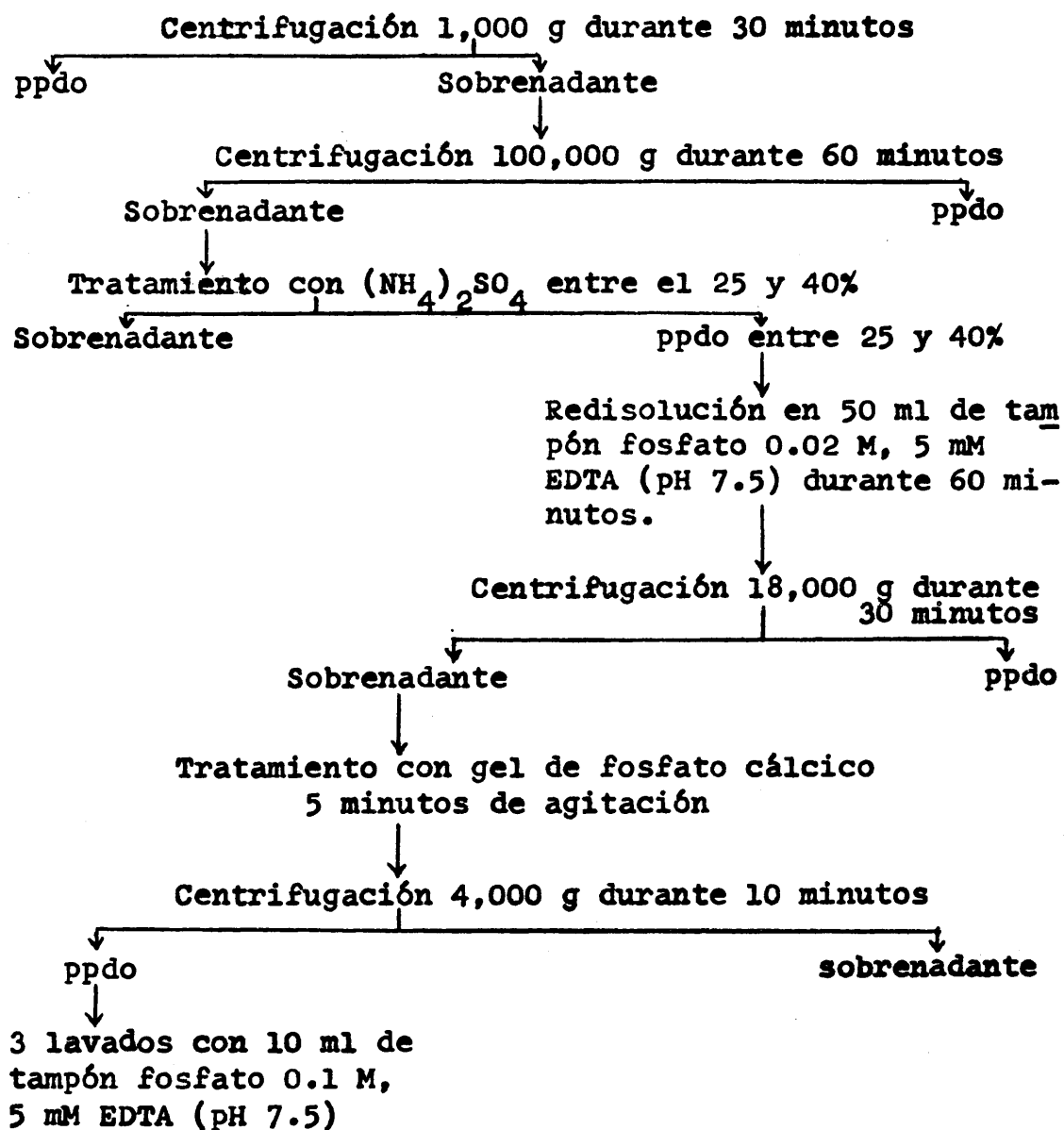
TABLA VIII

<u>Operación realizada</u>	<u>mg prot/ml</u>	<u>nmoles de ácidos grasos formados</u>
34,800 g x 15 minutos	60	0.283
34,800 g x 60 minutos	48	0.313
95,250 g x 30 minutos	47.5	0.293
95,250 g x 60 minutos	40.75	0.309
95,250 g x 90 minutos	39.25	0.296

La actividad de la Acido Graso Sintetasa es muy similar

ESQUEMA INICIAL DE AISLAMIENTO

Preparación del homogeneizado con 150 g de larva en 75 ml de tampón fosfato 0.1 M, 5 mM de EDTA (pH 7.5).



Las fracciones activas se reúnen y se pasan por columna de DEAE celulosa eluyendo con tampón fosfato a pH 7.5 de concentración creciente. La fracción activa obtenida por este proceso se pasa a continuación por Sephadex G-150.

en los cuatro casos por lo que la elección de la centrifugación a 95,250 g durante 90 minutos se debe a que la fracción soluble obtenida es más clara (por lo tanto con menos contaminaciones de fracción microsomal) que la realizada durante una hora.

3.4.2. PRECIPITACION CON SULFATO AMONICO

3.4.2.1. Condiciones de la precipitación

El sistema seguido para el estudio es:

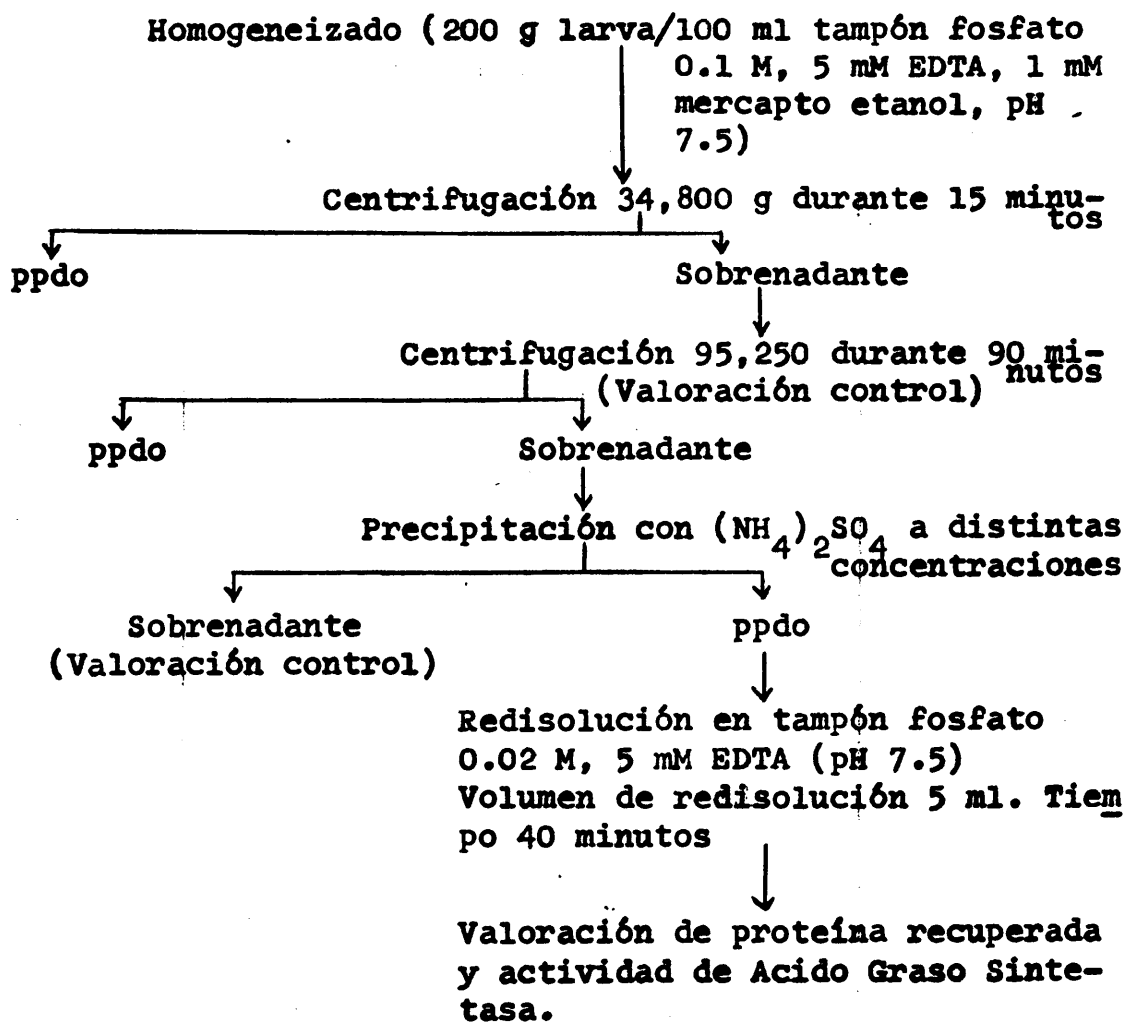


TABLA IX

Control Ultracentrifugación (25 mg/ml) - 1,439 nmoles de ácido graso formado				
<u>Operación</u>	<u>Sobrenadante</u>		<u>Precipitado redissuelto</u>	
	<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>	<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Precipitación al 15%	21.8	1.513	0.3	0.635
entre 15 y 25%	21.6	1.358	0.3	0.471
entre 25 y 45%	15.0	0.112	18.0	1.795
entre 45 y 70%	4.25	0.005	17.5	0.137

De estos datos no se puede deducir un límite de concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por debajo del cual no se produzca la precipitación de la Acido Graso Sintetasa. El límite superior queda próximo al 45-50%.

A partir de esta experiencia elegimos como límite superior el 50%. En experiencias posteriores se comprobó lo acertado de esta elección, como puede verse en la siguiente tabla.

TABLA X

<u>Ultracentrifugación</u>	<u>Sbte 50%</u>	<u>Redis. ppdo 50%</u>
1.264	0.094	1.541
1.160	0.017	1.484
1.166	0.018	1.231

Los resultados vienen dados en nmoles de ácidos grasos formados. Todos valorados en iguales condiciones de cone

centración de proteína (0.15 mg/ml).

3.4.2.2. Incidencia del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre el pH control

Se realizan medidas del pH durante el proceso:

- antes de la precipitación pH 7.5
- sobrenadante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.. pH 6.7
- precipitado redissuelto .. pH 6.9

Comparado con los datos obtenidos en el estudio del pH en el medio de incubación, la actividad baja a un 80% debido a la disminución del pH, por lo que éste debe mantenerse a pH 7.5 mediante la adición de KOH durante la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.4.2.3. Condiciones de redisolución del precipitado

- Se han estudiado:
- fuerza iónica del tampón de redisolución
 - concentración de proteína
 - tiempo de redisolución

Esquema de la experiencia:

Homogeneizado (225 g larva/75 ml tampón fosfato 0.1 M, 2 mM EDTA, 1 mM mercapto etanol (pH 7.5))

↓
Centrifugación 34,800 g durante 15 minutos

↓
Centrifugación 95,250 g durante 90 minutos

↓
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%

El precipitado obtenido se dividió en seis partes iguales que se redisolvieron en tampones 0.05 M, 0.15 M, 0.30 M (3 y 6 ml con cada uno), tomando alícuotas a distintos tiempos en las que se valora la cantidad de proteína recuperada y la actividad de Acido Graso Sintetasa.

TABLA XI

Fosfato (M)	Vol. (ml)	20 minutos		40 minutos		60 minutos	
		mg/ml	Act.	mg/ml	Act.	mg/ml	Act.
0.05	3	52	0.183	50	0.208	52	0.201
	6	32	0.178	32.5	0.153	33	0.157
0.15	3	50	0.182	51	0.207	50	0.147
	6	30.5	0.152	29.5	0.219	30.5	0.123
0.30	3	50	0.207	52	0.162	50	0.156
	6	30.5	0.155	20.5	0.147	32	0.173

Fosfato (M)	Vol. (ml)	90 minutos		120 minutos	
		mg/ml	Act.	mg/ml	Act.
0.05	3	50	0.146	51	0.144
	6	31.5	0.164	33	0.110
0.15	3	50	0.122	50	0.150
	6	30.5	0.131	31.5	0.136
0.30	3	50	0.146	52	0.149
	6	31.5	0.153	30.5	0.146

La actividad viene expresada en nmoles de ácido graso formado.

Dado que entre 0.05 y 0.15 están las máximas actividades de Acido Graso Sintetasa se concluye la conveniencia de seguir utilizando el tampón fosfato potásico 0.1 M. Como tiempo de redisolución se toma 40 minutos. No parece que la cantidad de tampón influya mucho sobre la redisolución, dado que la cantidad total de proteína extraída es muy parecida para ambos volúmenes de redisolución, obteniéndose en ambos casos una actividad casi análoga de la

Acido Graso Sintetasa.

3.4.3.1. Tratamiento con gel de fosfato cálcico

En el esquema inicial el paso siguiente a la precipitación con sulfato amónico, es la absorción de la proteína sobre gel de fosfato cálcico y su posterior elución por lavados sucesivos con tampón fosfato 0.1 M.

Inicialmente se han utilizado 4 g de gel para absorber aproximadamente 800 mg de proteína (en unos 40 ml). Los resultados indican que se retiene muy poca proteína sobre el gel y aunque el lavado presenta fuerte actividad de Acido Graso Sintetasa, se recupera poca proteína, presentando alta actividad también la proteína no retenida sobre el gel. Esto ha conducido a un estudio de las concentraciones relativas gel/proteína para tratar de establecer las condiciones óptimas para el tratamiento.

3.4.3.2. Relación gel/proteína

La redisolución después del tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se divide en cuatro partes iguales, cada una de 161 mg de proteína 15 ml a las que se somete a tratamiento con distintas cantidades de gel.

TABLA XII

<u>Controles:</u>	<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Sobrenadante ultracen- trifugación	29.00	0.214
Redisolución del pre- cipitado al 50%	10.75	0.311

	<u>0.8 g gel</u>		<u>1.2 g gel</u>		<u>1.6 g gel</u>		<u>2 g gel</u>	
	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>
Sbte tratamiento con gel	8.78	0.240	6.75	0.523	6.25	0.480	7.75	0.628
1ª lavado 0.1 M (10 ml)	0.225	0.645	0.3	0.470	0.215	0.687	0.29	0.969
2ª lavado 0.1 M (10 ml)	0.055	0.739	0.045	0.330	0.07	0.264	0.045	0.332

La actividad viene expresada en nmoles de ácido graso formado.

A la vista de los anteriores resultados se utilizó la relación gel/proteína 5. Sin embargo el comportamiento en el tratamiento oscila mucho de unas experiencias a otras:

TABLA XIII

	<u>A</u>		<u>B</u>		<u>C</u>	
	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>
Redisolución del ppdo al 50%	17.5	0.160	27.75	0.175	29	1.071
Sbte tratamiento con gel	11.75	0.038	26.25	0.147	27.25	0.781
1ª lavado 0.1 M	0.54	0.334	1.05	0.649	0.0755	0.874
2ª lavado 0.1 M	0.1	0.090	0.125	0.579	0.1	0.592
	<u>D</u>		<u>E</u>			
	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Act.</u>		
Redisolución del ppdo al 50%			27.75	1.695	42.25	1.029
Sbte tratamiento con gel			25	1.478	40.75	0.902
1ª lavado 0.1 M			0.605	0.954	1.44	0.225
2ª lavado 0.1 m			0.1	1.022	0.33	0.105

Por este motivo y dado que, como se comprueba posteriormente, la utilización de este método no es imprescindible para la obtención del sistema enzimático puro, no se tiene en cuenta su utilización.

3.4.4. DIALISIS; TRATAMIENTO CON SULFATO DE PROTAMINA

Antes de realizar el tratamiento con DEAE-celulosa, es conveniente la eliminación de las sales remanentes del tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de los ácidos nucleicos que puedan estar presentes, ya que estos dos factores pueden alterar las condiciones de retención de la proteína por el cambiador iónico.

3.4.4.1. Diálisis

Cuando la diálisis se realiza en bolsas de diálisis durante la noche en cámara fría frente a tampón 0.01 M, la actividad enzimática baja a un 40% del valor inicial.

TABLA XIV

	<u>mg/ml de proteína</u>	<u>nmoles de ácidos grasos formados</u>
antes de la diálisis	18.6	1.877
después de la diálisis (muestra I)	15.6	0.759
después de la diálisis (muestra II)	15.8	0.738

Además aparecen agregados de la proteína, que es necesario eliminar por centrifugación.

Por este motivo se utiliza el método de diálisis descrito en materiales y métodos (2.3.4.) en un Dializer b/HFD-1 con los siguientes resultados:

TABLA XV

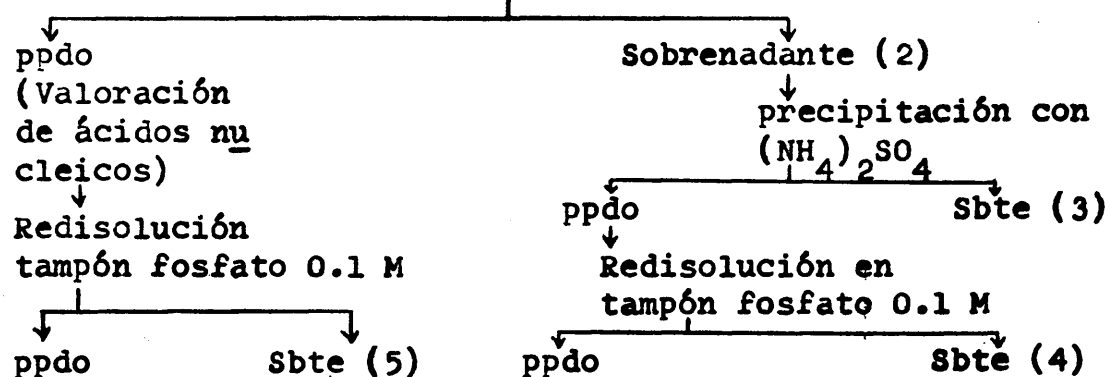
		<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Prueba I	antes diálisis	15	0.225
	después diálisis	13.5	0.274
Prueba II	antes diálisis	16	1.231
	después diálisis	14	1.450

3.4.4.2. Precipitación con sulfato de protamina

La experiencia se realiza según el siguiente esquema:

Redisolución ppdo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% dializada (1)

Precipitación con sulfato de protamina (0.12 mg/ml proteína) en solución 1% en fosfato 0.1 M



Con el control (5) se trata de comprobar si el precipitado es de ácidos nucleicos o de proteína.

TABLA XVI

	<u>mg/ml</u> <u>prot.</u>	<u>ml obtenidos</u>	<u>mg totales</u>	<u>nmoles de ácidos</u> <u>grasos formados</u>
1	5.25	25	131.00	0.832
2	2.35	25	58.17	1.418
3	0.07	25	1.75	0.040
4	3.80	15	57.00	1.350
5	0.205	50	10.25	0.953

3.4.4.3. Valoración de ácidos nucleicos

Se obtienen 78 mg de ácidos nucleicos en 500 mg de precitado producido por el tratamiento con sulfato de pro-tamina. Junto con los ácidos nucleicos precipita Acido Graso Sintetasa en una proporción apreciable; por lo tan-to y como se controla la retención de Acido Graso Sinteta-sa en DEAE-celulosa no es necesaria su utilización, cosa que se confirma posteriormente dado que en la fracción que contiene la actividad enzimática después del trata-miento con DEAE-celulosa no aparecen ácidos nucleicos.

3.4.5. TRATAMIENTO CON DEAE-CELULOSA

Inicialmente se ha utilizado el método de elución con gradiente discontinuo de tampón a través de una columna que contiene el DEAE-celulosa.

Las figuras 11 a 16 corresponden a algunas de las expe-riencias realizadas.

Fig. 11: lavados de gel de fosfato cálcico

3 ml (\approx 0.3 mg) Actividad: nmoles de ácido
graso formado 0.236

Fig. 12: Redisolución del precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% dializada. 50 mg proteína. Act. 1.295 nmoles de ácidos graso formado.

Fig. 13: Redisolución del precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% dializada. 800 mg proteína. Act. 0.233 nmoles de ácido graso formado.

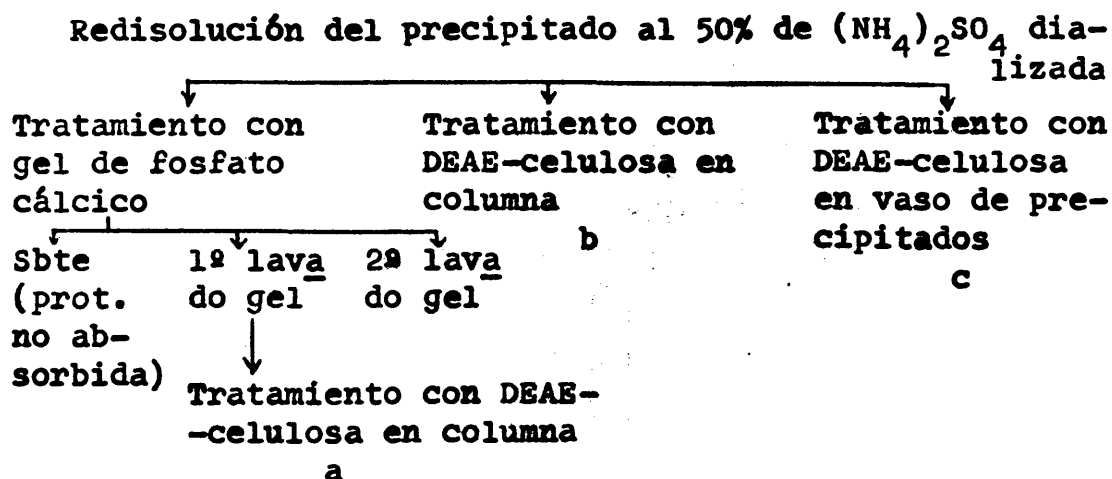
Fig. 14: Sobrenadante del tratamiento con gel + 1ª y 2ª lavados 0.1 M. 15 mg proteína. Act. 0.168 nmoles de ácido graso formado.

Fig. 15: 1^{er} lavado 0.1 M de gel de fosfato cálcico. 18.8 mg de proteína. Act. 1.897 nmoles de ácido graso formado.

Fig. 16: 1^{er} lavado de gel de fosfato cálcico. 18 mg proteína. Act. 0.954 nmoles de ácido graso formado.

Del estudio de estos resultados se desprende que bajo las condiciones utilizadas, el tratamiento con DEAE-celulosa no queda controlado. Por tanto se procede a realizar dicho tratamiento por agitación con cargas aisladas, realizándose una experiencia para contrastar los resultados obtenidos por este método y por el de tratamiento en columna.

El esquema global de la experiencia es:



Los resultados obtenidos son:

- a) Tratamiento con gel de fosfato cálcico y tratamiento con DEAE-celulosa.

	Act. nmoles de ácido graso formado
Proteína no retenida (4.3 mg/ml)	2.866
1er lavado (1.37 mg/ml)	1.649
2º lavado (0.08 mg/ml)	0.640

La Fig. 17 corresponde al tratamiento con DEAE-celulosa: Muestra 8.14 mg de 1er lavado gel.

- b) El tratamiento con DEAE-celulosa en columna de la redisolución dializada aparece en la fig. 18. Muestra 14.75 mg. Act. 5.150 nmoles de ácido graso formado.
- c) Tratamiento en vaso de precipitados de la redisolución dializada.

TABLA XVII

	<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Sobrenadante	0.152	0.816
lavado 0.01 M	0.092	0.342
lavado 0.3 M	0.103	1.305
2º lav. 0.3 M	0.052	0.337
lavado 0.5 M	0.097	0.196

que parece indicar que se logra una mayor retención de la proteína sobre el DEAE-celulosa.

Posteriormente, un aumento de la relación DEAE-celulosa/proteína, condujo a una mejor retención.

TABLA XVIII

	<u>ml de tampón utilizados</u>	<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Sobrenadante	100	0.99	0.146
1 ^{er} lavado 0.01 M	75	0.56	0.099
2º lavado 0.01 M	75	0.29	0.075
1ª extracción 0.3 M	75	0.98	2.405
2ª extracción 0.3 M	75	0.90	2.596
3ª extracción 0.3 M	75	0.64	1.924
lavado final 0.5 M	75	0.41	0.891

Los resultados son reproducibles; queda controlado el tratamiento. El método además permite la recuperación de la proteína, en casos de una mala retención, por repetición del tratamiento. Así, por ejemplo si obtenemos

TABLA XIX

	<u>ml de tampón utilizados</u>	<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácidos grasos formados</u>
Redisolución dializada	100	12.00	1.450
Sbte tratamiento DEAE-celulosa	100	2.75	1.392
1 ^{er} lavado 0.01 M	75	0.73	0.837
2 ^a lavado 0.01 M	75	0.40	0.074
1 ^a extracción 0.3 M	75	1.35	1.687
2 ^a extracción 0.3 M	75	1.08	0.125
3 ^a extracción 0.3 M	75	0.57	0.981
lavado final 0.5 M	75	0.57	0.462

El sobrenadante y primer lavado poseen bastante actividad de Acido Graso Sintetasa. La mezcla de ambos sometida a un nuevo tratamiento con DEAE-celulosa, en iguales condiciones, rinde los resultados de la Tabla XX.

TABLA XX

	<u>ml de tampón utilizados</u>	<u>mg/ml</u>	<u>nmoles de ácidos grasos formados</u>
Sobrenadante	100	0.54	0.039
1 ^{er} lavado 0.01 M	75	0.31	0.029
2 ^a lavado 0.01 M	75	0.18	0.038
1 ^a extracción 0.3 M	75	0.53	1.560
2 ^a extracción 0.3 M	75	0.28	1.475
3 ^a extracción 0.3 M	75	0.50	1.255
lavado final 0.5 M	75	0.175	0.390

3.4.6. CROMATOGRAFIA SOBRE SEPHADEX G-150

La elución se realiza con tampón fosfato 0.25 M.

En las múltiples experiencias realizadas aparecen dos perfiles de elución. El primero de ellos consta de dos picos, uno de ellos corresponde al volumen de exclusión y el otro bastante alejado de aquél.

El segundo perfil posee tres picos, dos coincidentes con los del caso anterior y el tercero con un volumen de elución que podría corresponder a una proteína de peso molecular mitad de la que eluye con el volumen vacío.

Ambos perfiles de elución aparecen en las figuras 19 y 20.

Fig. 19: 1.8 mg de enzima purificada. Act. 1.331 nmoles de ácidos grasos formados.

Fig. 20: 1.8 mg de enzima purificada. Act. 2.887 nmoles de ácidos grasos formados.

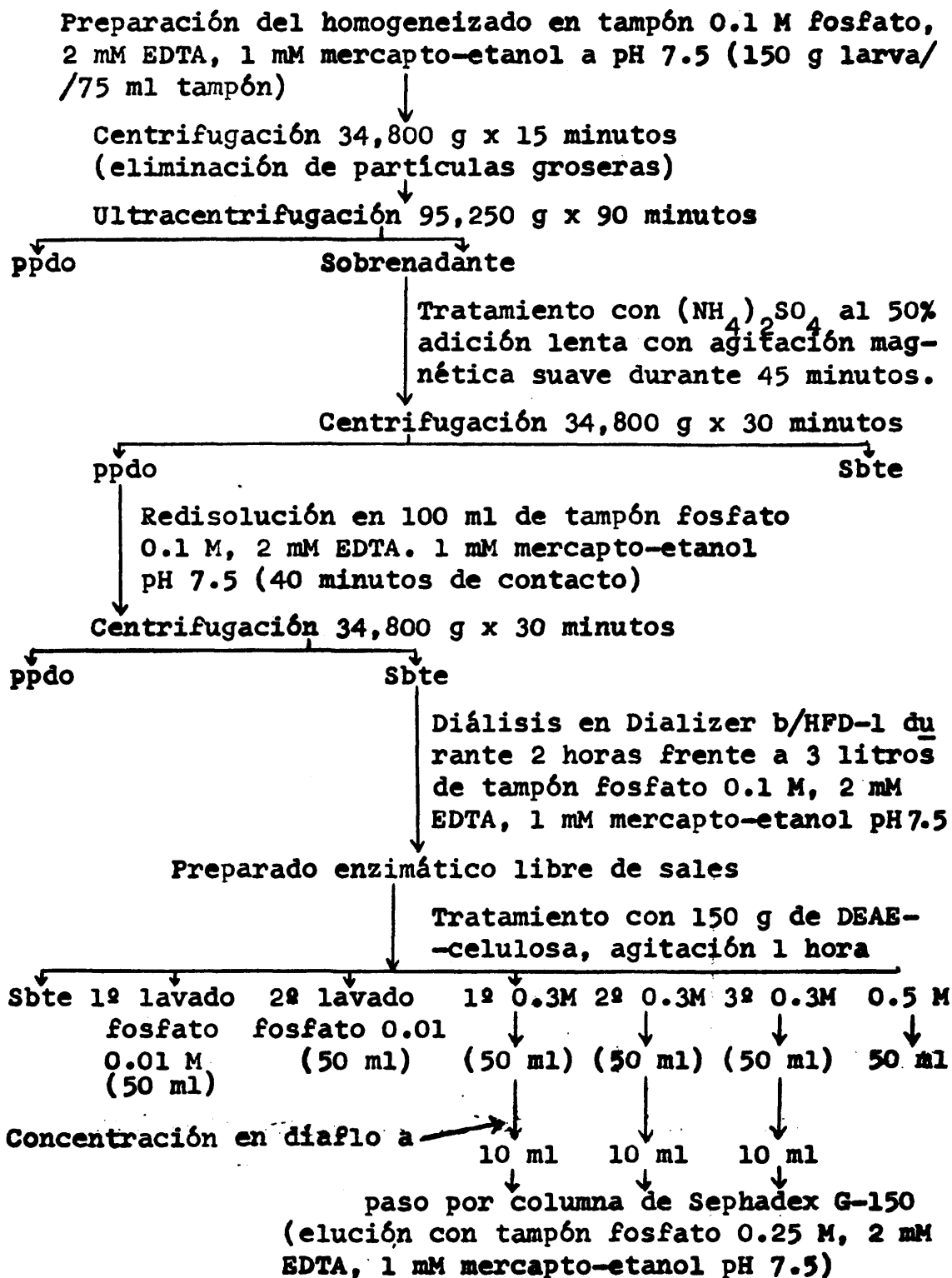
En cuanto a la actividad enzimática aparece en el pico inicial en los dos casos pero también en el pico intermedio del 2º caso, lo cual podría deberse a que la proteína se disocia en el proceso de aislamiento y la actividad que exhibe corresponde a la reasociación que tenga lugar durante el proceso de valoración.

El que la actividad aparezca en el volumen de la columna de Sephadex G-150 (volumen de exclusión 400,000) indica que se trata de un complejo multienzimático.

La existencia de una proteína de peso molecular mitad procedente del complejo multienzimático se ha confirmado cuando se determina el peso molecular de la enzima en Sephadex G-200 (3.8.1.1.).

3.4.7. ESQUEMA ACTUAL DE AISLAMIENTO Y PURIFICACION

De los estudios anteriores se concluye como método óptimo de purificación de Acido Graso Sintetasa el siguiente:



Se obtienen dos picos; el 1º correspondiente al volumen de exclusión es el que presenta fuerte actividad de Acido Graso Sintetasa.

3.5. CONSERVACION DE LA ENZIMA EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE SU PURIFICACION

Dado lo prolongado del proceso de aislamiento y purificación de la enzima, era preciso conocer los momentos más adecuados del proceso en los que su interrupción condujera a mínima pérdida de actividad.

3.5.1. PRECIPITACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El precipitado obtenido se divide en dos partes: una de ellas se redisuelve en el momento, valorándose una alícuota y almacenando el resto a -14°C para valorar 48 horas después. La otra parte se redisuelve a las 48 horas de su conservación a -14°C .

TABLA XXI

<u>Operación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Redisolución en el momento y valoración $t=0$	0.088
Redisolución en el momento y valoración $t=48$ horas	0.046
Redisolución a las 48 horas y valoración inmediata	0.218

Hay una pérdida de actividad en la fracción redisuelta pero no así en el precipitado conservado a -14°C .

Con objeto de evaluar la conservación de la actividad en la fracción precipitada mantenida a -14°C se lleva a cabo otra experiencia dividiendo el precipitado en seis partes iguales, que se redisuelve en días sucesivos.

TABLA XXII

<u>Operación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Redisolución en el momento	0.202
" a las 24 horas	0.173
" a las 48 horas	0.386
" a los 4 días	0.432
" a los 7 días	0.034
" a los 12 días	0.186

En esta ocasión el almacenamiento se hizo a -14°C y bajo atmósfera de N_2 .

3.5.2. LIOFILIZACION DE LA PROTEINA

La proteína redisuelta después de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se liofiliza y observa el mantenimiento de la actividad. Para ello se divide el liofilizado en cuatro partes iguales valorándose dos de ellas en el momento de su obtención disueltas en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.5 y almacenándose las otras dos en ampollas cerradas bajo atmósfera de N_2 para valoraciones posteriores.

TABLA XXIIII

<u>Operación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
Control antes de liofilizar	0.354
Después de liofilizar	0.476
A los 10 días después de haber liofilizado	0.151
A los 25 días después de haber liofilizado	0.114

Es decir, no es adecuada la liofilización en esta etapa de purificación puesto que hay pérdida significativa de la actividad.

Por lo tanto podemos detener el aislamiento en la etapa de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conservando el precipitado a -14°C bajo atmósfera de N_2 .

3.5.3. CONSERVACION DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DEAE-CELULOSA

Se ha llevado a cabo una experiencia destinada a controlar las condiciones de concentración de mercapto-etanol y de temperatura de almacenamiento más idóneas para la conservación de la actividad enzimática.

TABLA XXIV

Control: Actividad inicial 1.883 nmoles de ácido graso formado

<u>Temperatura de almacenamiento</u>	<u>mercapto-etanol concentración (mM)</u>	<u>Act. 1 día</u>	<u>Act. 5 días</u>
4°C	1.0	0.910	0.272
	3.5	1.380	0.352
	6.0	1.666	0.342
-18°C	1.0	0.789	0.346
	3.5	0.583	0.466
	6.0	0.303	0.310
-60°C	1.0	1.724	1.359
	3.5	1.913	2.016
	6.0	0.879	0.736

La temperatura a la cual es más estable la enzima es -60°C y la concentración de mercapto-etanol entre 1 y 3.5 mM.

Se hace otra prueba controlando condiciones ya exclusivamente a -60°C.

TABLA XXV

Actividad inicial 1.810 nmoles de ácido graso formado

<u>mercapto-etanol concent. (mM)</u>	<u>2 días</u>	<u>4 días</u>	<u>6 días</u>	<u>10 días</u>	<u>13 días</u>
1	1.775	1.459	1.057	1.030	1.037
3.5	1.796	1.399	1.038	0.973	0.876
6	1.713	1.096	0.923	0.908	0.896

La conservación de actividad es total a los 2 días (tiempo suficiente para proseguir el aislamiento), y queda reducida aproximadamente al 60% en los 13 días siguientes.

En cuanto a la concentración de mercapto-etanol, se utiliza la 1 mM por ser la que más lentamente admite la pér-dida de la actividad de Acido Graso Sintetasa.

3.5.4. CONSERVACION DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DEAE-CELU- LOSA DE PROTEINA CONCENTRADA EN DIAFLO

La proteína una vez concentrada se divide en dos partes iguales que se conservan a -60°C y que se valoran a las 24 y 48 horas siguientes.

TABLA XXVI

	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
En el momento de su concentración	0.881
A las 24 horas	1.029
A las 48 horas	0.999

3.6. METODOS DE CONCENTRACION DE LA DISOLUCION DE PROTEINA

Después del tratamiento con DEAE-celulosa y con Sephadex, se obtiene una disolución proteica bastante diluída, lo que obliga a su concentración para su posterior utilización en la cromatografía sobre Sephadex o su conservación para estudios posteriores.

Los métodos de concentración que se han utilizado son los siguientes:

- a) Polivinil pirrolidona. Su utilización conduce a la pérdida total de la actividad enzimática.
- b) Sephadex. Se produce pérdida apreciable de actividad

enzimática específica y no se recupera la totalidad de la proteína.

- c) Dializador b/HFD-1. Se recupera un 70% de la actividad enzimática específica pero se pierde un 50% de la proteína inicial.
- d) Liphogel. Se conserva la totalidad de la actividad enzimática específica pero se pierde un 50% de la proteína.
- e) Diaflo. Se conserva la totalidad de la actividad enzimática específica y no se pierde proteína, por lo que éste es el método de concentración de proteínas que se utiliza.

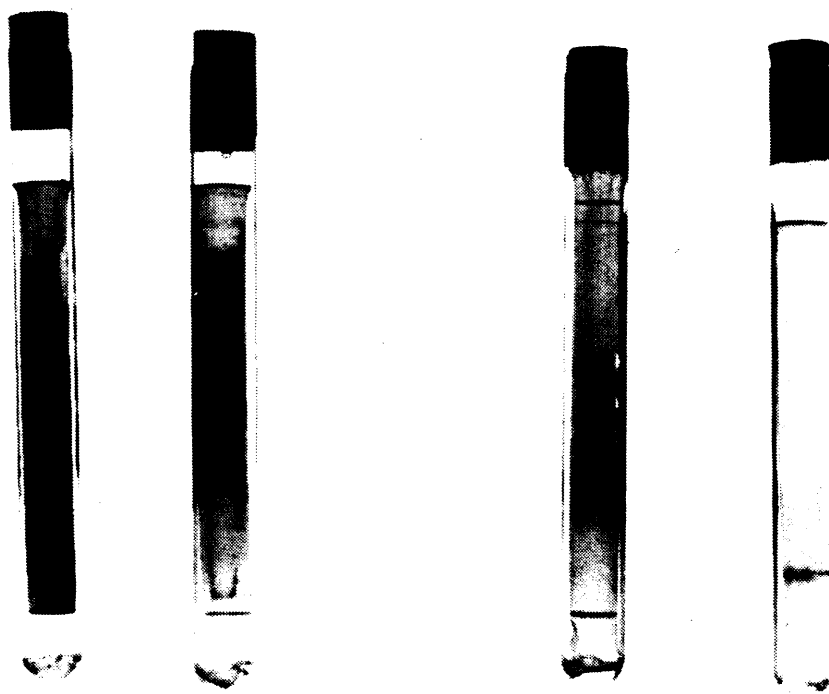
3.7. COMPROBACIÓN DE LA PURIFICACION DURANTE EL PROCESO DE AISLAMIENTO

Como criterios de purificación se han utilizado:

- a) El aumento de la actividad específica a lo largo del proceso de purificación (Tabla XXVII).
- b) Cromatografía en columna de Sephadex G-200 donde aparece un único pico de peso molecular 560,000 (a veces aparece un 2º pico de peso molecular mitad correspondiente a la disociación de la proteína).
- c) La electroforesis en gel de poliacrilamida, cuyos resultados aparecen en las fotos adjuntas:
 - 1) Proteína obtenida después de la ultracentrifugación.
 - 2) Proteína después del tratamiento con sulfato amónico.
 - 3) Proteína después del tratamiento con DEAE-ce-

lulosa.

- 4) Proteína después del paso sobre la columna de Sephadex G-150.



3.8. PROPIEDADES DE LA ACIDO GRASO SINTETASA

3.8.1. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

Para ello se utilizan dos procedimientos, cromatografía en columna de Sephadex G-200 y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

3.8.1.1. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES EN SEPHADEX G-200

Como se indica en la parte de Materiales y Métodos (2.9.1.2.) se pasa una colección de proteínas de peso mo-

TABLA XXVII

<u>Paso</u>	<u>Vol. (ml)</u>	<u>nmoles de A.G. por ml</u>	<u>nmoles de A.G. totales</u>	<u>proteína mg/ml</u>	<u>proteína total (mg)</u>	<u>nmoles de A.G. por mg de pro- teína</u>	<u>Rendimiento %</u>	<u>Purifica- ción (veces)</u>
Ultracen- trifugación	110	1.264	139.04	27.25	2,995.50	0.046	100.0	-
Tratamiento (NH ₄) ₂ SO ₄	55	1.541	84.75	6.25	343.75	0.246	61.0	5
DEAE-celu- losa	25	1.927	48.17	0.46	11.50	4.189	34.5	90
Sephadex	10	2.326	23.26	0.27	2.75	13.291	17.0	182

lecular conocido a través de una columna de Sephadex G-200 obteniéndose una curva patrón sobre la que se determina el peso molecular de la Acido Graso Sintetasa.

La primera curva patrón se realizó pasando una a una las proteínas indicadas en la Tabla XXVIII a través de la columna y eluyendo con tampón fosfato potásico 0.1 M (pH 7.5).

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla XXVIII y en la gráfica 21.

TABLA XXVIII

	<u>PM</u>	<u>mg.</u>	<u>nm</u>	<u>V_e (ml)</u>
Azul dextrano				58
Ferritina	540,000	0.5-2	280	75
Catalasa	240,000	0.2	280	95
Aldolasa	158,000	0.5-1	230	100
Albúmina	67,000	2	230	114
Albúmina	45,000	1-3	230	123
Pepsina	35,000	1-2	230	122
Quimiotripsinógeno	25,000	1-2	230	127
Citocromo c	12,500	0.5-2.5	410	142
Acido Graso	560,000			74.5
Sintetasa	260,000	1-2	280	89

Los valores de peso molecular para la Acido Graso Sintetasa son de 560,000 y 260,000 daltons.

A la vista de estos datos, se impone conocer más exactamente la naturaleza de la curva en el intervalo 240,000-540,000 en el cual eluye la Acido Graso Sintetasa en su forma disociada y por encima de 540,000. Para ello se re-

pite dos veces el proceso anteriormente descrito obteniéndose los resultados expresados en las tablas XXIX y XXX y en las gráficas 22 y 23.

TABLA XXIX

V_e azul de dextrano 71-75 ml.

tampón fosfato potásico 0.25 M pH 7.5

	<u>M</u>	<u>mg.</u>	<u>nm</u>	<u>V_e (ml)</u>
Arginina descarboxilasa	850,000 85,000	1-2	250	72-76 117
Tiroglobulina	669,000	1-2	230	75-80
Ferritina	540,000	0.5-2	280	76-80
Catalasa	240,000	0.2	280	94-97
Aldolasa	158,000	0.5-1	230	95-99
Albúmina	67,000	2	230	108-112
Albúmina	45,000	1-3	230	130-133
Quimiotripsinógeno A	25,000	1-2	230	135-138
Citocromo c	12,500	0.5-2.5	410	150-151
Acido Graso Sintetasa	560,000	1-2	260	76-80

TABLA XXX

V _e azul de dextrano 66-70 ml.				
tampón fosfato sódico 0.25 M, 1 mM mercapto-etanol pH 7.5				
	<u>M</u>	<u>mg.</u>	<u>nm</u>	<u>V_e (ml)</u>
Arginina				
descarboxilasa	850,000	1-2	250	66-70
Tiroglobulina	669,000	1-2	230	65-69
Ferritina	540,000	0.5-2	280	71-75
Glutamato				
deshidrogenasa	510,000	1-2	280	73-77
Fosforilasa A	370,000	1-2	280	77-81
Catalasa	240,000	0.2	280	85-89
Aldolasa	158,000	0.5-1	230	92-95
Albúmina	67,000	2	230	104-107
Albúmina	45,000	1-3	230	108-113
Pepsina	35,000	1-2	230	100-105
Quimiotripsinógeno A	25,000	1-2	230	132-135
Citocromo c	12,500	0.5-2.5	410	148-152
Acido Graso Sintetasa	—	1-2	260	68-71 → 560,000
Acido Graso Sintetasa en SDS al 0.05%	—	1-2	260	78-72 → 280,000 105 → 80,000 112 → 60,000 130 → 25,000

En las tres experiencias realizadas la Acido Graso Sintetasa aparece con un peso molecular aproximado de — 560,000 daltons, habiéndose obtenido además en la primera de ellas otra fracción proteica con un peso molecular de

260,000, es decir, aproximadamente la mitad del primero. Esto puede relacionarse con lo obtenido en los complejos multienzimáticos de aves y de mamíferos en los que aparece como un dímero activo que se disocia en dos monómeros inactivos de peso molecular mitad.

Cuando se utiliza la proteína tratada con SDS al 0.05% aparece toda una serie de fracciones que se corresponden con los valores obtenidos cuando se realizan electroforesis en presencia de SDS como veremos en el apartado siguiente. La fracción de mayor peso molecular obtenida da un valor de 280,000 por lo que se puede considerar que el tratamiento con SDS disocia el complejo en dos monómeros de peso molecular mitad.

3.8.1.2. Determinación de pesos moleculares por electroforesis en presencia de dodecil sulfato sódico

La primera prueba se realiza utilizando como marcadores proteínas cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 12,500 y 68,000, con un entrecruzamiento 1/37 (relación bisacrilamida/acrilamida) y una reticulación 7.5%. El tiempo de electroforesis fue de 2 h. 30 min. a 80 voltios.

Los geles, una vez desteñidos, se densitometran y la movilidad se expresa como distancia del máximo de la banda al origen del gel. Algunas proteínas comerciales originan más de una banda, las que no se tienen en consideración a no ser que correspondan a pesos moleculares de las subunidades o de productos de agregación.

Al representar movilidad frente a log. de peso molecular se obtiene una recta (fig. 24):

TABLA XXXI

<u>Proteína</u>	<u>M</u>	<u>Movilidad</u>
Pepsina	35,000	5.0
Tripsina	23,300	6.2
Citocromo c	12,500	6.5 y 8.7
Avidina	68,000	1.8
Lisozima	14,300	7.9
Albúmina de suero de caballo	68,000	2.7

Se hace una segunda prueba en las mismas condiciones y poniendo además otro gel con Láctico Deshidrogenasa (M = 160,000); en otros geles se ponen mezclas de las proteínas utilizadas en la Tabla XXXI. Se obtiene una recta, pero la LDH no entra en el gel, solamente se detecta la subunidad de peso molecular 36,000.

En las siguientes experiencias se trata de ampliar el intervalo de pesos moleculares que pueden ser calculados por electroforesis en SDS. Se estudia también lo que ocurre con reticulaciones del 5% y 3.5%, con el mismo tiempo de corrido, e igual voltaje y entrecruzamiento. Al 3.5%, debido a la poca consistencia de los geles no se obtienen resultados satisfactorios. Los resultados del 5% aparecen en la Tabla XXXII y en la fig. 25.

TABLA XXXII

<u>Proteína</u>	<u>M</u>	<u>Movilidad</u>
Tripsina	23,300	7.9
Pepsina	35,000	5.2
Citocromo c	12,500	10.3 y 8.2 (d)
Avidina	68,000	2.4 y 9.4 (s)

Con una reticulación superior, 10%, las movilidades de las proteínas son menores; ello ofrece, por tanto, menor interés, aunque también se obtiene una variación lineal de la movilidad frente al log. del peso molecular (Tabla XXXIII, fig. 26).

TABLA XXXIII

<u>Proteína</u>	<u>M</u>	<u>Movilidad</u>
Citocromo c	12,500	8.7 y 6.5 (d)
Lisozima	14,300	7.9
Tripsina	23,300	5.0
Pepsina	35,000	4.0
Avidina	68,000	1.3 y 8.5 (s)
Albúmina	68,000	1.6

A continuación, con las proteínas antes indicadas se hace un estudio comparativo de movilidades a entrecruzamientos 1/37 y 1/60 (Tabla XXXIV, fig. 27).

TABLA XXXIV

<u>Proteína</u>	<u>Mov. 1/37</u>	<u>Mov. 1/60</u>
Pepsina	5.8	10.0
Avidina	0.7 y 13.5 (s)	2.6 y 17.0 (s)
Albúmina	0.4	2.0

La movilidad es mayor con entrecruzamiento 1/60, penetrando las proteínas de peso molecular mayor en el gel más que con entrecruzamiento 1/37.

Se vuelven a estudiar distintos grados de entrecruzamientos con nuevas proteínas de pesos moleculares superio-

res y con un tiempo de corrido de 5 horas (Tabla XXXV).

TABLA XXXV

<u>Proteínas</u>	<u>M</u>	<u>nº subunidades</u>	<u>peso molecular de subunidades</u>
Fosfatasa Alcalina	80,000	2	40,000
Ureasa	483,000	6	83,000
Amilasa	97,600	2	48,200
Piruvico Quinasa	237,600	4	57,400

En la gráfica 28, utilizando un entrecruzamiento 1/37 aparecen las subunidades; la movilidad es mayor con un entrecruzamiento 1/60; penetrando proteínas de peso molecular mayor.

En la gráfica 29 se ve cómo aumentando el tiempo de electroforesis a 7 horas la Piruvico Quinasa ($M = 237,000$) penetra ya en el gel.

La siguiente experiencia se realiza con entrecruzamiento 1/60, a 80 voltios, siendo el tiempo de corrido de 7 horas 30 minutos. Además de proteínas patrones se pone en un gel Acido Graso Sintetasa (fig. 30), obteniéndose una movilidad inferior a la de la Piruvico Quinasa, por lo tanto un peso molecular superior, del orden de 300,000.

En las siguientes experiencias, con 1/60, 80 voltios durante 5 horas, se calcula el peso molecular de la Acido Graso Sintetasa a distintas reticulaciones: 7.5% y 5%.

Los valores obtenidos a partir de la gráfica 31 son:

TABLA XXXVI

<u>Reticulación</u>	<u>Peso Molecular</u>
7.5%	300,000
	250,000
	75,000
	64,000
5%	220,000
	72,000
	63,000

Habiéndose obtenido una banda que puede corresponder a un peso molecular 300,000, se varía la relación bisacrilamida/acrilamida para así poder lograr una mayor penetración de la proteína en el gel.

Se hacen dos estudios comparativos de entrecruzamientos 1/60 y 1/80 con reticulaciones 7.5% y 5%, utilizando como marcador una proteína de peso molecular superior al de la Piruvico Quinasa, la Ferrina de 540,000. El problema que presenta el entrecruzamiento 1/80 es la poca consistencia del gel, sobre todo a reticulación 5%.

Para proteínas de elevado peso molecular (mayores que 250,000), no se obtiene una línea recta, sino una asíntota al eje de ordenadas.

Los resultados obtenidos para Acido Graso Sintetasa fueron (Tabla XXVII, figuras 32 y 33):

TABLA XXXVII

<u>Entrecruzamiento</u>	<u>Reticulación</u>	<u>M</u>
1/60	5%	240,000
		118,000
1/80	5%	260,000
1/80	7.5%	240,000
		122,000
		110,000

De estos datos se deduce la aparición de una serie de bandas correspondientes a la disociación del complejo multienzimático. La banda de mayor peso molecular responde a un valor de 240,000 - 260,000 coincidente con el obtenido en Sephadex G-200 para la proteína disociada.

La existencia de otras bandas de peso molecular menor concuerda con los datos obtenidos en el apartado anterior para la proteína tratada con SDS, coincidiendo aproximadamente con los de alguna de las experiencias realizadas con gel. Estas bandas pueden asignarse a cadenas polipeptídicas disociadas del complejo; no ha lugar, de otro lado, a su consideración como impurezas, puesto que tanto la cromatografía en Sephadex G-200 como la electroforesis en gel de poliacrilamida, sin SDS, dan una única banda.

3.8.2. COMPOSICION DE AMINOACIDOS

3.8.2.1. Análisis de aminoácidos

De la valoración realizada en 4 muestras diferentes se obtienen los siguientes resultados expresados en %:

TABLA XXXVIII

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
ASP	11.1	11.25	11.16	11.25
THR	5.5	5.56	5.60	5.79
SER	6.8	7.37	6.64	6.54
GLU	13.8	13.71	12.00	12.83
PRO	4.0	5.43	4.96	2.57
GLY	8.6	8.79	7.93	7.93
ALA	9.8	9.83	8.15	8.50
VAL	5.7	5.68	6.39	6.44
MET	-	-	1.14	1.13
ILE	4.8	4.9	5.58	5.40
LEU	8.9	6.6	8.82	7.46
TYR	2.8	2.45	2.96	3.39
PHE	3.4	3.23	3.35	4.36
HIS	2.3	2.58	2.52	2.05
LYS	7.4	5.82	7.70	7.58
ARG	4.8	4.78	4.81	6.82

3.8.2.2. Valoración de triptófano

Se utilizan dos métodos. El de Beaven-Holiday que emplea la fórmula

$$\frac{M_{\text{tyr}}}{M_{\text{tryp}}} = \frac{0.592 A_{294.4} - 0.263 A_{280}}{0.263 A_{280} - 0.170 A_{294.4}}$$

en la que al sustituir los datos experimentales

$$A_{294.4} = 0.296$$

$$A_{280} = 0.334$$

se obtiene el valor $\frac{M_{\text{tyr}}}{M_{\text{tryp}}} = 2.312$

El peso molecular obtenido para la proteína es de 560,000 y el porcentaje medio de tirosina hallado en el análisis de aminoácidos anterior puede considerarse como 2.9%. Si tomamos un peso molecular medio de 120 para los aminoácidos, resultaría un total de 4.660 aminoácidos de los que 135.14 serían tirosina, por lo que de triptófano tendremos

$$\frac{M_{\text{tyr}}}{M_{\text{tryp}}} = \frac{135.14}{M_{\text{tryp}}} = 2.312$$

que da un número de moles de triptófano de 58.8.

Utilizando el método de Edelhoch y trabajando también con un 1 mg/ml en una solución de cloruro de guanidinio 6 M, se obtiene los siguientes resultados:

$$\begin{array}{l|l} A_{288} = 0.49 & \text{que aplicados a la fórmula:} \\ A_{280} = 0.55 & \end{array}$$

$$\text{moles de triptófano} = \frac{A_{288}}{3.103} - \frac{A_{280}}{10.318} = 0.0001046$$

moles de triptófano por gramo de proteína

Dado que el peso molecular de la proteína es 560,000, el número de moles de triptófano en la proteína total serán

$$0.0001046 \times 560,000 = 58.57 \text{ moles}$$

valor que coincide con el obtenido por el método de Beaven-Holiday.

3.8.2.3. Composición final en aminoácidos de la proteína

Hemos visto que el número de moles de triptófano es de 59. Por otro lado, como veremos en (3.8.9.) el número de moles de cisteína es de 42. De estos datos y de los obtenidos en 3.7.2.1. para el resto de los aminoácidos se obtienen en la Tabla XXLIX los porcentajes que corresponde a la composición de aminoácidos.

TABLA XXLIX

<u>aa</u>	<u>Porcentajes</u>
ASP	10.91
THR	5.47
SER	6.49
GLU	11.73
PRO	4.85
GLY	7.75
ALA	7.97
VAL	6.24
MET	1.11
ILE	5.45
LEU	8.62
TYR	2.89
PHE	3.27
HIS	2.46
LYS	7.53
ARG	4.70
CYS	0.89
TRP	1.25

3.8.3. REQUERIMIENTOS DE LA ACCION ENZIMATICA

Una vez aislada la Acido Graso Sintetasa y comprobada su homogeneidad se procede al estudio de las condiciones de actuación del complejo multienzimático aislado.

3.8.3.1. pH óptimo de actuación del sistema enzimático

Experiencia realizada con mezcla de incubación estandar, en tampón fosfato 0.25 M (a pH variable) y con una concentración de proteína de 0.06 mg/ml (Tabla XL, fig. 34).

TABLA XL

<u>pH incubación</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
6.5	0.863
6.8	1.047
7.1	1.221
7.4	1.268
7.7	1.104
8.0	0.876

Como se ve el máximo de actividad está en las proximidades de pH 7.4.

3.8.3.2. Influencia de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática

Se realiza la experiencia con mezcla de incubación estandar (concentración de fosfato 0.25 M) durante 10 minutos a 37°C. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla XLI y fig. 35.

TABLA XLI

<u>Concentración proteína</u> <u>mg/ml incubación</u>	<u>nmoles de ácido</u> <u>graso formado</u>
0.027	0.621
0.054	0.866
0.081	1.144
0.108	1.362
0.162	1.638
0.216	1.610

Puede verse que a concentraciones de proteína 0.027 - 0.150 mg/ml existe una proporcionalidad directa con respecto a la actividad enzimática.

Cuando la proteína está purificada, un aumento de proteína se corresponde con un aumento de actividad a diferencia de lo que ocurría en homogeneizado total.

3.8.3.3. Influencia de la fuerza iónica del medio

Realizado con mezcla de incubación estandar y concentraciones crecientes de fosfato potásico. Incubaciones durante 10 minutos a 37°C (Tabla XLII, fig. 36).

TABLA XLII

<u>Concentración (M)</u> <u>fosfato</u>	<u>nmoles de ácido</u> <u>graso formado</u>
0.05	1.808
0.07	1.733
0.10	1.719
0.25	1.657
0.50	1.589
0.80	1.532

La variación de la fuerza iónica del medio no parece influir sobre la actividad enzimática a concentraciones comprendidas entre 0.05 y 0.8 M.

3.8.4. CONSERVACION DE LA ENZIMA

La enzima purificada se conserva en tubos cerrados a -60°C, en tampón fosfato 0.25 M, 2 mM EDTA, 1 mM mercapto-etanol, hasta el momento de su utilización. Para controlar la posible pérdida de actividad, se realizan valoraciones en días sucesivos a la obtención, de forma que todas las alícuotas valoradas hayan sufrido un único proceso de congelación-descongelación.

Se ha realizado dos veces la experiencia, una primera con solo dos referencias de conservación (Tabla XLIII).

TABLA XLIII

<u>tiempo de alma-</u> <u>cenamiento</u>	<u>nmoles de ácido</u> <u>graso formado</u>	<u>% de actividad</u> <u>conservada</u>
0	2.325	100.00
4 días	2.131	96.63
18 días	1.890	81.30

Y otra en la que los datos de conservación se obtienen con mayor frecuencia (Tabla XLIV y fig. 37).

TABLA XLIV

<u>tiempo de almacenamiento</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>	<u>% de actividad conservada</u>
0	0.881	100.00
2 días	0.866	98.4
8 días	0.837	95.0
10 días	0.789	89.6
14 días	0.548	62.2

La pérdida de actividad es mínima a lo largo de los 8 días siguientes a la obtención del preparado. Al cabo de 14 días se conserva todavía un 60% en el caso de la experiencia más desfavorable.

Esto permite realizar las experiencias de funcionalidad bioquímica o caracterización física en días subsiguientes al de la purificación del preparado.

3.8.5. TIEMPO DE INCUBACION

Mezcla de incubación estandar con variación del tiempo de incubación (Tabla XLV y fig. 38).

TABLA XLV

<u>tiempo de incubación (minutos)</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
5	1.112
10	1.623
20	1.918
30	1.925
45	2.010
60	1.613

El tiempo óptimo de incubación es entre 20 y 45 minutos; dado que la actividad a los 10 minutos es un 85% con respecto a la obtenida a los 20 minutos, y que el tiempo óptimo de incubación en otras etapas de la purificación es de 10 minutos, es por lo que se ha mantenido este tiempo de incubación; tiempo al que la actividad es suficiente para la valoración del sistema enzimático, y que la hace comparativa con otras etapas de la purificación.

Las etapas de purificación para las que también se ha probado el tiempo de incubación han sido las que a continuación se detallan:

- a) En la segunda etapa del aislamiento, la redisolución del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%, utilizando la mezcla de incubación estandar, en tampón fosfato 0.11 M. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla XLVI y fig. 39.

TABLA XLVI

<u>tiempo de incubación a 37°C (minutos)</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
5	1.695
10	1.752
20	1.775
30	1.802

- b) En la fracción activa después del tratamiento con DEAE-celulosa, con una mezcla de incubación estandar en tampón fosfato 0.25 M (Tabla XLVII y fig. 40).

TABLA XLVII

<u>tiempo de incubación a 37°C (minutos)</u>	<u>nmoles de ácido graso formado</u>
5	1.007
10	1.165
20	1.120
30	1.103
60	0.914

**3.8.6. REQUERIMIENTOS DE NUCLEOTIDOS DE LA ENZIMA (FMN,
NADH, NADPH)**

Dado que en la reacción catalizada por la Acido Graso Sintetasa tienen lugar dos etapas de reducción y que el agente reductor, como se vió en la introducción, varía de unas especies a otras, en los siguientes apartados se estudia la naturaleza de los nucleótidos utilizados por la Acido Graso Sintetasa de *Ceratitis capitata*.

3.8.6.1. Influencia de los niveles de NADH sobre la actividad enzimática

Mezcla de incubación estandar excepto NADPH y distintas cantidades de NADH. La incubación se realizó durante 10 minutos a 37°C con una cantidad de proteína de 0.06 mg/ml (Tabla XLVIII, fig. 41).

TABLA XLVIII

<u>concentración NADH</u> <u>(μM)</u>	<u>nmoles de ácido</u> <u>graso formado</u>
3.12	0.050
6.25	0.060
12.50	0.067
18.75	0.068
25.00	0.068
50.0	0.070
100.0	0.068
200.0	0.081
300.0	0.077

La actividad enzimática es muy baja en presencia de NADH.

3.8.6.2. Influencia de los niveles de NADPH sobre la actividad enzimática

Mezcla de incubación estandar con distintas cantidades de NADPH; la incubación se realizó durante 10 minutos a 37°C con una cantidad de proteína 0.06 mg/ml (Tabla XLIX, fig. 42).

TABLA XLIX

<u>concentración NADPH</u> <u>(μM)</u>	<u>nmoles de ácido</u> <u>graso formado</u>
3.12	0.190
6.25	0.296
12.50	0.378
18.75	0.433
25.00	0.434
50.00	0.112
100.00	0.475
200.00	0.489
300.00	0.480

Como puede verse la actividad enzimática en presencia de NADPH aumenta considerablemente con relación a la obtenida en presencia de NADH. Esta diferencia se verá más palpablemente en los apartados 3.8.6.3. y 3.8.6.4.

3.8.6.3. Actuación conjunta NADH-NADPH

Condiciones estandar de valoración (excepto NADPH) y distintas concentraciones de ambos nucleótidos. La incubación se realizó durante 10 minutos a 37°C (Tabla L, fig. 43).

TABLA L

<u>NADPH</u> <u>(μM)</u>	<u>NADH</u> <u>(μM)</u>	<u>nmoles de ácido graso</u> <u>formado</u>
75	-	1.570
150	-	1.796
300	-	1.692
600	-	1.665
-	75	0.193
-	150	0.208
-	300	0.279
-	600	0.319
75	75	1.503
150	150	1.768
300	300	1.864

Se aprecia más ostensible que en 3.8.6.1. y 3.8.6.2. la diferencia de actividad en presencia de NADH o de -- NADPH. Cuando se utiliza una mezcla de ambos, la formación de ácidos grasos se corresponde a la obtenida cuando se utiliza únicamente NADPH en la misma concentración que en la mezcla. Este hecho no comparte la afirmación (169) de que solamente los vertebrados utilizan NADPH como único agente reductor.

3.8.6.4. Actuación conjunta NADH - FMN y NADPH - FMN

Realizados en condiciones estandar de valoración (excepto NADPH) y distintas concentraciones de nucleótidos. La incubación se realiza durante 10 minutos a 37°C con una concentración de proteína 0.06 mg/ml (Tabla LI, fig. 44).

TABLA LI

<u>NADPH</u> <u>(μM)</u>	<u>NADH</u> <u>(μM)</u>	<u>FMN</u> <u>(μM)</u>	<u>nmoles de ácido graso</u> <u>formado</u>
25	-	-	0.349
50	-	-	0.753
75	-	-	0.862
100	-	-	0.928
300	-	-	0.956
25	-	25	0.086
50	-	50	0.137
75	-	75	0.159
100	-	100	0.022
300	-	300	0.017
-	25	-	0.020
-	50	-	0.027
-	75	-	0.046
-	100	-	0.035
-	300	-	0.026
-	25	25	-
-	50	50	-
-	75	75	-
-	100	100	-
-	300	300	0.011

Por un lado se confirma, una vez más, la diferencia de incorporación en presencia de ambos nucleótidos de piridina. También puede apreciarse que frente a lo que ocurre en las especies que contienen FMN, en las que la presencia de éste en el medio de incubación es activador del complejo multienzimático, en el caso del sistema enzimático

co de larva de *Ceratitis capitata* el nucleótido de flavina actúa claramente como inhibidor.

3.8.6.5. Presencia de FMN

Se sigue el procedimiento indicado en el apartado 2.9.3.1. de Materiales y Métodos. Se obtiene un resultado negativo en cuanto a la presencia de FMN en la Acido Graso Sintetasa.

Esto parece confirmado por los resultados obtenidos en 3.8.6.4. en los que aparece un efecto inhibidor sobre NADPH y ninguna influencia activadora sobre NADH; efecto éste último que se observa, por el contrario, en los sistemas de Acido Graso Sintetasa poseedores de FMN.

3.8.7. CINETICA DE MICHAELIS

Se obtiene los valores de K_M y V_M con relación a Acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH.

3.8.7.1. Acetil-CoA

La mezcla de incubación es:

Fosfato potásico	0.25 M (pH 7.5)
EDTA	4.2 mM
Mercapto-etanol	3.6 mM
Malonil-CoA	100 μ M
NADPH	300 μ M
Proteína	0.06 mg/ml

y distintas concentraciones de Acetil-CoA 1- 14 C de actividad específica 4.42 μ Ci/ μ mol. Incubaciones durante 5 minutos a 37°C (Tabla LII, fig. 45 y 46).

TABLA LII

<u>Acetil-CoA</u> <u>(μM)</u>	<u>V</u> <u>(*)</u>	<u>1/Acetil-CoA</u> <u>(μM^{-1})</u>	<u>1/V</u>
1.13	0.036	0.8850	27.777
2.26	0.065	0.4425	15.384
4.52	0.115	0.2212	8.695
6.78	0.171	0.1475	5.847
9.04	0.174	0.1106	5.747
11.30	0.191	0.0885	5.235
22.60	0.249	0.0442	4.016
33.90	0.278	0.0295	3.597
45.20	0.286	0.0221	3.496
56.50	0.285	0.0177	3.508
67.80	0.290	0.0147	3.448

(*) La velocidad viene expresada en nmoles de ácidos grasos formados por minuto de incubación.

Los valores obtenidos para K_M y V_M son:

$$K_M = \frac{1}{0.095} = 10.5 \mu\text{M}$$

$$V_{\text{max}} = \frac{1}{2.70} = 0.370 \text{ nmoles ácido graso formado por minuto}$$

3.8.7.2. Malonil-CoA

La mezcla de incubación es:

Fosfato potásico	0.25 M (pH 7.5)
EDTA	4.2 mM
Mercapto-etanol	3.6 mM
Acetil-CoA 1^{14}C	50 μM (Actividad específica 1 uCi/ μmol)
NADPH	300 μM
Proteína	0.06 mg/ml

y distintas concentraciones de malonil-CoA. Incubación 5 minutos a 37°C (Tabla LIII, fig. 47 y 48).

TABLA LIII

<u>Malonil-CoA</u> <u>(μM)</u>	<u>V</u> <u>(*)</u>	<u>1/malonil-CoA</u> <u>(μM^{-1})</u>	<u>1/V</u>
2.5	0.0066	0.400	151.515
5.0	0.0132	0.200	75.750
7.5	0.0194	0.133	51.546
10.0	0.0258	0.100	38.759
25.0	0.0544	0.040	18.382
50.0	0.0802	0.020	12.468
75.0	0.0852	0.013	11.737
100.0	0.0996	0.010	10.040
150.0	0.0922	0.006	10.845
200.0	0.0692	0.005	14.450

(*) La velocidad viene expresada en nmoles de ácidos grasos formados por minuto de incubación.

Los valores obtenidos para K_M y V_{\max} son:

$$K_M = \frac{1}{0.0125} = 80 \mu\text{M}$$

$$V_m = \frac{1}{4.9415} = 0.202 \text{ nmoles ac. grasos formados por minuto}$$

3.8.7.3 NADPH

La mezcla de incubación es:

Fosfato potásico	0.25 M (pH 7.5)
EDTA	4.2 mM
Mercapto-etanol	3.6 mM
Acetil-CoA 1^{14}C	50 μM (Actividad específica 1 uCi/ μmol)
Malonil-CoA	100 μM
Proteína	0.06 mg/ml

y concentraciones variables de NADPH. La incubación es de 5 minutos a 37°C. (Tabla LIV, fig. 49 y 50).

TABLA LIV

<u>NADPH</u> <u>(μM)</u>	<u>V</u> <u>(*)</u>	<u>1/NADPH</u> <u>(μM^{-1})</u>	<u>1/V</u>
3.12	0.0088	0.320	113.636
6.25	0.0152	0.160	65.789
12.50	0.0234	0.080	42.735
18.75	0.0272	0.053	36.764
25.00	0.0320	0.040	31.250
50.00	0.0344	0.020	29.069
100.00	0.0468	0.010	21.367
200.00	0.0458	0.005	21.834
300.00	0.0458	0.003	21.834

(*) La velocidad viene expresada en nmoles de ácidos grasos formados por minuto de incubación.

Los valores obtenidos para K_M y V_{max} son:

$$K_M = \frac{1}{0.065} = 15.4 \mu\text{M}$$

$$V_m = \frac{1}{18.680} = 0.053 \text{ nmoles } \text{ác. grasos formados por minuto}$$

3.8.8. PRESENCIA DE 4'-FOSFOPANTETEINA

La identificación de 4'-fosfopanteteína dio resultados positivos al utilizar cualquiera de los dos métodos de oxidación con ácido per fórmico descritos en Materiales y Métodos (2.9.3.2.).

Al comparar el esquema de aminoácidos obtenido a par-

tir del hidrolizado de la proteína después del tratamiento oxidante (52) con el obtenido utilizando el hidrolizado de aminoácidos normal (51) aparecen dos picos, uno de ellos correspondiente a β -alanina y que se encuentra entre los correspondientes a tirosina y fenilalanina. El otro pico corresponde a taurina y aparece después del ácido cisteico. Ambos tienen los mismos tiempos de retención que los obtenidos cuando utilizamos patrones de β -alanina y taurina.

3.8.9. VALORACION DE GRUPOS SH

La valoración de grupos SH se realiza con 0.18 mg de Acido Graso Sintetasa purificada según el esquema general de aislamiento pero realizando la última etapa de paso a través de Sephadex G-150 en ausencia de mercapto-etanol para evitar las interferencias debidas a éste.

Paralelamente se realiza una curva patrón de grupos SH con concentraciones conocidas de cisteína (Tabla LV, fig. 53).

TABLA LV

<u>nmoles de SH</u>	<u>A₄₁₂</u>
5	0.11
10	0.20
20	0.35
30	0.50
40	0.64
50	0.70

El resultado obtenido aparece en la Tabla LV.

La valoración se realiza también en presencia de urea 8 M.

TABLA LVI

	<u>/A</u>	<u>nmoles SH</u>	<u>moles SH/mol de AGS</u>
AGS (0.18 mg)	0.145	7	21.77
AGS en urea 8 M	0.21	11	34.2

Se añade a continuación imidazol (a varias concentraciones) como medio reductor y se repiten las medidas de absorbancia.

TABLA LVII

	<u>5 μM</u>	<u>10 μM</u>	<u>100 μM</u>	<u>200 μM</u>	<u>nmoles SH</u>	<u>moles SH/ /moles AGS</u>
AGS	0.19	0.22	0.24	0.24	13	40.4
AGS en urea 8 M	0.25	0.24	0.25	0.25	14	41.3

La presencia de urea aumenta el número de grupos SH.

Cuando la valoración se realiza en un medio reductor aumenta también el número de grupos SH.

3.8.10. ACIDOS GRASOS PRODUCIDOS POR EL COMPLEJO MULTITIEN- ZIMATICO

La mezcla de incubación es la estandar salvo para acetil-CoA que se utiliza a una concentración de 216 nmoles/ml y para malonil Co-A que se dispone en dos concentraciones 50 y 100 nmoles/ml.

Los resultados obtenidos expresados en tantos por cien de ácidos grasos formados son (Tabla LVIII, fig. 54 y 55):

TABLA LVIII

Acidos grasos sintetizados	Concentración de malonil-CoA por ml de incubación	
	50 nmoles	100 nmoles
C ₁₀	2.12	--
C ₁₂	27.54	21.70
C ₁₄	12.39	10.80
C ₁₆	56.37	65.98
C ₁₈	1.55	1.48

El ácido graso formado en mayor proporción es el palmítico. En segundo lugar se produce el laúrico siendo el tercero en importancia el mirístico.

Al aumentar la relación malonil-CoA/acetil-CoA, se produce un aumento en la proporción de ácido palmítico formado a costa de los ácidos grasos de cadena más corta, resultados que concuerdan con los obtenidos en glándula mamaria de conejo y vaca (6, 159).

En cuanto a la forma en que aparecen los ácidos grasos formados, se realiza la valoración de Acil-CoA descrita en Materiales y Métodos.

Se utiliza la incubación estandar excepto Acetil-CoA que se emplea a una concentración de 125 nmoles/ml (0.5 µCi) valorándose la cantidad de ácidos grasos formados tanto en forma libre como de Acil-CoA.

TABLA LIX

nmoles de ácidos grasos libres formados	nmoles de Acil-CoA formados	% Acil-CoA	
		% AGL	% Acil-CoA
6.492	0.117	98.23	1.77
4.356	0.057	98.70	1.26

Es decir, los ácidos grasos producidos por la Acido Graso Sintetasa de la larva de *Ceratitis capitata* se obtienen en su forma libre.

4. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

4.1. Introducción:

Las notables diferencias existentes en la síntesis de ácidos grasos en larva y en adulto farato del insecto *Ceratitis capitata* parecen apuntar a que dicha biosíntesis se produce en larva principalmente por un mecanismo de biosíntesis "de novo", siendo un mecanismo de elongación mitocondrial el más importante en adulto farato. Parece interesante proceder al aislamiento y caracterización de la Acido Graso Sintetasa de larva, enzima responsable de la biosíntesis "de novo". El sistema de AGS no ha sido aislado ni caracterizado hasta el presente en ningún insecto. El desconocimiento de este sistema enzimático puede hacerse extensivo a los invertebrados.

Por todos estos motivos el aislamiento, caracterización y estudio de los requerimientos funcionales de la actividad del sistema enzimático Acido Graso Sintetasa del insecto *Ceratitis capitata* ha constituido el elemento central de la investigación objeto de esta tesis doctoral.

4.2. Experiencias preliminares al aislamiento.

4.2.1. Al valorar la actividad de Acetil-CoA Carboxilasa y la síntesis de ácidos grasos a lo largo del desarrollo del insecto aparece un máximo de actividad de biosíntesis de ácidos gra-

sos en el 4º estado de larva y otro en las proximidades de la emergencia del adulto farato, mientras que solo aparece un máximo de actividad de Acetil CoA Carboxilasa para el 4º estado de larva.

4.2.2. Los experimentos sobre ayuno y realimentación con diferentes dietas demuestran la naturaleza adaptativa de la Acido Graso Sintetasa de larva.

4.2.3. A continuación se pone a punto un método de valoración de la Acido Graso Sintetasa, variando cofactores, tiempo de incubación, concentración de enzima, concentración de tampón fosfato y pH del medio.

Los resultados anteriores, junto con los obtenidos por este método, confirman que la biosíntesis "de novo" solo se produce en larva, pero no en adulto farato de 5 y 8 días.

4.2.4. Cuando se realiza el fraccionamiento subcelular del homogeneizado total de larva la Acido Graso Sintetasa se localiza en la fracción soluble.

4.2.5. Puesto a punto un sistema de valoración de síntesis de ácidos grasos en mitocondrias, se ve que este sistema funciona tanto en larva

como en adulto farato de 8 días, por lo que en adulto farato puede ser este sistema el responsable del máximo de actividad que aparece en dicho estado de desarrollo.

4.3. Aislamiento, purificación y caracterización del sistema enzimático.

4.3.1. El aislamiento y purificación de la Acido Graso Sintetasa se realiza estudiando las condiciones idóneas dentro de cada una de las etapas de dicho aislamiento (ultracentrifugación, precipitación con sulfato amónico, tratamiento con gel de fosfato cálcico, DEAE-celulosa, Sephadex) y su utilidad en nuestro caso concreto.

Se obtiene el esquema de aislamiento y purificación que aparece en 3.4.7.

4.3.2. Una vez comprobada la purificación de la Acido Graso Sintetasa por electroforesis en gel de poliacrilamida y en Sephadex G-200, se ve que ha sido purificada unas 180 veces con un rendimiento del 17%.

4.3.3. Se han puesto a punto las condiciones para la conservación de la proteína tanto a lo largo de la purificación, como una vez obtenida pura.

4.3.4. Se ha realizado el análisis de aminoácidos de la Acido Graso Sintetasa. Su peso molecular,

obtenido por cromatografía en Sephadex-G-200 es de 560,000 daltons, apareciendo también una subunidad de 260,000.

Cuando la determinación del peso molecular se realiza por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS se confirma la banda de 260,000 daltons, que aparece junto con otras de peso molecular inferior, atribuidas a la disociación de alguno de los componentes del complejo.

4.3.5. Se han estudiado los requerimientos para la acción enzimática del sistema enzimático purificado, pH, concentración de proteína, fuerza iónica y tiempo de incubación.

4.3.6. La Acido Graso Sintetasa parece requerir para su actuación únicamente NADPH como nucleótido reducido, siendo la actividad enzimática muy baja en presencia de NADH.

No se detecta en la proteína la existencia de FMN. Cuando se incuba el sistema enzimático en presencia de este cofactor aparece un efecto inhibitor sobre NADPH y ninguna influencia activadora sobre NADH (efecto este último que se contradice con lo observado en especies que poseen FMN).

4.3.7. Se han obtenido los valores de K_M y V_{max} para Acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH.

- 4.3.8. Se ha detectado la presencia de 4'-fopanteteína en el complejo multienzimático.
- 4.3.9. El número de grupos SH identificados ha sido de 41, pasando a ser 42 en presencia de urea 8 M.
- 4.3.10. El principal ácido graso biosintetizado por el complejo multienzimático es palmítico, siguiéndole en importancia laúrico y mirístico. Todos estos ácidos grasos se obtienen en su forma libre.

la fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Sobresaliente cum laude

Madrid, 5 de junio de 1975

Alfonso López

José R.

Manuel Oro

F. José Olea

Alfonso

Manuel

5. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Majerus P.W., Alberts A.W. y Vagelos P.R. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1231 (1964).
2. Vagelos P.R., Majerus P.W., Alberts A.W., Larrabee A.R. y Ailhaud G.P. - Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol, 25, 1485 (1966).
3. Overath P. y Stumpf P.K. - J. Biol. Chem., 239, 4103 (1964).
4. Brooks J.L. y Stumpf P.K. - Arch. Biochem. Biophys., 116, 108 (1966).
5. Lynen F. Hagen A., Hopper-Kessel I., Oesterhelt D., Reeves H.C., Schweizer E., Willecke K. y Yalpani M. - Organizational Biosynthesis (ed. Vogel H.J., Lampen J.O. y Brysen V.) pág. 243 (1967), New York: Academic Press.
6. Carey E.M. y Dils R. - Biochim. Biophys. Acta, 210, 371 (1970).
7. Hsu R.Y. y Hun S.L. - Biochemistry, 9, 239 (1970).
8. Yang P.C., Butterworth P.H.W., Bock R.M. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 242, 3501 (1967).
9. Burton D.N., Haavik A.G. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 126, 141 (1968).
10. Smith S. y Abraham S. - J. Biol. Chem., 245, 3209 (1970)
11. Willecke K., Ritter E. y Lynen F. - Eur. J. Biochem., 8, 503 (1969).
12. Jacobs E.J., Butterworth P.H.W. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 124, 392 (1968).
13. Lynen F. - Methods in Enzymology vol. XIV pág. 17 (1969), New York: Academic Press.
14. Oesterhelt D., Baur H. y Lynen F. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63, 1377 (1969).
15. Weeks G. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 243, 1180 (1968)

16. Williamson I.P. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 241, 2326 (1966).
17. Majerus P.W., Alberts A.W. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 240, 618 (1965).
18. Phillips G.T., Nixon J.E., Abramovitz A.S. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 138, 357 (1970).
19. Alberts A.W., Majerus P.W., Talamo B. y Vagelos P.R. - Biochemistry, 3, 1563 (1964).
20. Nixon J.E., Phillips G.T., Abramovitz A.S. y Porter J.V. - Arch. Biochem. Biophys., 138, 372 (1970).
21. Kumar S., Dorsey J.A., Muesing R.A. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 245, 4732 (1970).
22. Phillips G.T., Nixon J.E., Dorsey J.A., Butterworth P.H.W., Chesterton C.J. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 138, 380 (1970).
23. Toomey R.E. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 241, 1159 (1966).
24. Bloch K. - Accts. Chem. Res., 2, 193 (1969).
25. Barnes E.M. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 243, 2955 (1968).
26. Barnes E.M. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 245, 3122 (1970).
27. Plate C.A., Joshi V.C. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 245, 2868 (1970).
28. Collins J.C., Craig M., Nebokroeft C., Kennan A.L. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 143, 343 (1971).
29. Hsu R.Y. y Wagner B.J. - Biochemistry, 9, 245 (1970).
30. Dugan R.E. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 245, 2051 (1970).
31. Hsu R.Y., Wasson G. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 240, 2736 (1965).
32. Brady R.O., Bradley R.M. y Trams E.G. - J. Biol. Chem., 235, 3093 (1960).
33. Lynen F. - Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 20, 941 (1961).
34. Dugan R.E., Slakey L.L. y Porter J.W. - J. Biol. Chem.,

245, 6312 (1970).

35. Drysdale J. - Comunicación personal a J.W. Porter citada en Int. J. Biochem., 3, 15 (1972).
36. Butterworth P.H.W., Yang P.C., Bock R.M. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 242, 3508 (1967).
37. Kumar S., Dorsey J.K. y Porter J.W. - Biochem. Biophys. Res. Commun 40, 825 (1970).
38. Sumper M., Riepertinger C. y Lynen F.C. - P.E.B.S. letters, 5, 45 (1969).
39. Kumar S., Muesing R.A. y Porter J.W. - J. Biol. Chem, 247, 4749 (1972).
40. Butterworth P.H.W. y Bloch K. - Eur. J. Biochem., 12, 496 (1970).
41. Klein H.P. - J. Bacteriol., 92, 130 (1966).
42. Simoni R.D., Criddle R.S. y Stumpf P.K. - J. Biol. Chem., 242, 573 (1967).
43. Huang K.P. y Stumpf P.K. - Arch. Biochem. Biophys., 143, 412 (1971).
44. Larrabee A.R., Mc Daniel E.D., Backerman H.A. y Vagelos P.R. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 267 (1965).
45. Smith S. y Abraham S. - Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 28, 537 (1969).
46. Lynen F. - Biochem. J., 102, 381 (1967).
47. Pirson W., Schuhmann L. y Lynen F. - Eur. J. Biochem, 36, 16 (1973).
48. Sumper M., Oesterhelt D., Riepertinger C. y Lynen F. - Eur. J. Biochem., 10, 377 (1969).
49. Brock D.J.H., Kass L.R. y Bloch K. - J. Biol. Chem., 242, 4432 (1967).
50. Brindley D.N., Matsumara S. y Bloch K. - Nature, 242, 666 (1969).
51. Schweizer E., Willocke K., Winnewisser W. y Lynen F. - Vit. Horm., 28, 329 (1970).
52. Ziegenhorn J. - Ph. D. Thesis, University of Munich (1970).

53. Joshi V.C., Plate C.A. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 245, 2857 (1970).
54. Joshi V.C. y Wakil S.J. - Arch. Biochem. Biophys., 143, 493 (1971).
55. Delo J., Ernst-Fomberg M.L. y Bloch K. - Arch. Biochem. Biophys., 143, 384 (1971).
56. Ernst-Fomberg M.L. y Bloch K. - Arch. Biochem. Biophys., 143, 392 (1971).
57. Majerus P.W. y Vagelos P.R. - Advan. Lipid. Res., 5, 1 (1967).
58. Van der Bosch H. y Vagelos P.R. - Biochim. Biophys. Acta 218, 233 (1970).
59. Porter J.W., Kumar S. y Dugan R.E. - Progress in Biochemical Pharmacology (ed. Holmes W.L. y Bortz W.M.) vol. 6, pag. 1 (1971) Basel: Karger.
60. Vanamau T.C., Wakil S.J. y Hill R.L. - J. Biol. Chem., 243, 6409 (1968).
61. Ailhaud G.P., Vagelos P.R. y Goldfine H. - J. Biol. Chem., 242, 4459 (1967).
62. Matsumara S. - Biochem. Biophys. Res. Commun, 38, 238 (1970).
63. Wells W.W., Schulze J. y Lynen F. - Biochem. Z, 346, 474 (1967).
64. Chesterton C.J., Butterworth P.H.W., Abramovitz A.S., Jacob E.J. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 124, 386 (1968).
65. Roncari D.A.K., Bradshaw R.A. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 247, 6234 (1972).
66. Abita J.P., Lazdunski M. y Ailhaud G.P. - Eur. J. Biochem., 23, 412 (1971).
67. Hancock W.S., Prescott D.J., Marshall G.J. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 247, 6224 (1972).
68. Prescott D.J., Elovson J. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 244, 4517 (1969).
69. Powell G.L., Elovson J. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 244, 5616 (1969).

70. Vagelos P.R. y Larrabee A.R. - J. Biol. Chem., 242, 1776 (1967).
71. Elovson J. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 243, 3603 (1968).
72. Tweto J., Liberati M. y Larrabee A.R. - J. Biol. Chem., 246, 2468 (1971).
73. Tweto J. y Larrabee A.R. - J. Biol. Chem., 247, 4900 (1972).
74. Alberts A.W., Goldman P. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 238, 557 (1963).
75. Greenspan M.D., Alberts A.W. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 244, 6477 (1969).
76. Prescott D.J. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 245, 5484 (1970).
77. Wakil S.J., Mizugaki M., Shapiro M. y Weeks G. - Membrane models and the formation of biological membranes ed. L. Bolis, B.A. Pethica, 122, Amsterdam: North Holland (1968).
78. Birge C.H. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 247, 4930 (1972).
79. Birge C.H. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 247, 4921 (1972).
80. Kass L.R., Brock D.J.H. y Bloch K. - J. Biol. Chem., 242, 4418 (1967).
81. Schweizer E., Piccinini F., Duba C., Gunther S., Ritler E. y Lynen F. - Eur. J. Biochem., 15, 483 (1970).
82. Lynen F. - Biochemical Society Symposia n° 35 pag.3, Current trends in the biochemistry of lipids(1971).
83. Hagen A. y Hofschneider P.H. - Proc. Enz. Reg. Congr. Electron. Microc. 3rd., B; 69 Prague; Czeschoslovak, Academic of Sciences.
84. Pilz I., Herbst M., Kratky O., Oesterhelt D. y Lynen F. - Eur. J. Biochem., 13, 55 (1970).
85. Bressler R. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 237, 1441 (1962).
86. Jacobs R., Kilburn E. y Majerus P.W. - J. Biol. Chem., 245, 6462 (1970).

87. Kumar S. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 246, 7780 (1971).
88. Yun S.L. y Hsu R.Y. - J. Biol. Chem., 247, 2689 (1972)
89. Dorsey J.A. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 243, 3512 (1968).
90. Takayama K., MacLennan D.A., Tzagoloff A. y Stoner C.D. - Arch. Biochem. Biophys., 114, 223 (1964).
91. Van der Boch H., Williamson J.R. y Vagelos P.R. - Nature, 228, 338 (1970).
92. Zakin D. y Ho W. - Biochim. Biophys. Acta, 222, 558 (1970).
93. Craig M.D., Dugan R.E., Muesing R.A., Slakey L.L. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 151, 128 (1972).
94. Allmann D.W. y Gibson D.M. - J. Lipid. Res., 6, 51 (1965).
95. Volpe J.J. y Kishimoto Y.K. - J. Neurochem., 19, 737 (1972).
96. Smith S. y Abraham S. - Arch. Biochem. Biophys., 136, 112 (1970).
97. Gibson D.M. y Hubbard D.D. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 3, 331 (1960).
98. Dahlen J.V., Kennan A.L. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 124, 51 (1968).
99. Volpe J.J. y Vagelos P.R. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 889 (1974).
100. Wakil S.J., Goldman J.K., Williamson J.P. y Toomey R.E. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 880 (1966).
101. Plate C.A., Joshi V.C., Sedgwick B. y Wakil S.J. - J. Biol. Chem., 243, 5439 (1968).
102. Lynen F., Hopper-Kessel J. y Eggerer H. - Biochem. Z, 340, 95 (1964).
103. Tubbs P.K. y Garland P.B. - Biochem. J, 89, 258 (1963).
104. Robinson J.D., Brady R.O. y Bradley R.M. - J. Lipid. Res., 4, 144 (1963).

- 191 -
105. Bortz W.M. y Lynen F. - Biochem. Z, 339, 77 (1963).
 106. Lust G. y Lynen F. - Eur. J. Biochem., 7, 68 (1968).
 107. Burton D.N., Collins J.M., Kennan A.L. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 244, 4510 (1969).
 108. Butterworth P.D.W., Guchwait R.B., Baum H., Olsen E.B., Margolis S.A. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 116, 453 (1966).
 109. Volpe J.J. y Vagelos P.R. - Anual Rev. Biochem., 42, 21 (1973).
 110. Hicks S.E., Allman A.W. y Gibson D.M.C. - Biochim. Biophys. Acta, 106, 441 (1965).
 111. Craig M.C., Nepokroeff C.M., Laksmanan M.R. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 152, 619 (1972).
 112. Carey E.M. y Dils R. - Biochim. Biophys. Acta, 210, 371 (1970).
 113. Schweizer E. y Bolling H. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 67, 660 (1970).
 114. Schweizer E., Kühn L. y Castorph H. - Z. Physiol. Chem., 352, 327 (1971).
 115. Gilbert L.J. - Adv. Insect. Physiol (Acad. Press), 4, 69 (1967).
 116. Fast P.G. - "Progress in the Chemistry of fats and other lipids" XI - 2, 169 (1970) (Pergamon Press)
 117. Barlow J.S. - Nature, London, 197, 311 (1973).
 118. Tamaki Y. y Kawai S. - Botyn-Kagaku, 32, 63 (1967).
 119. Zebe E. y Mushan W.H. - Biochim. Biophys. Acta, 31, 513 (1959).
 120. Tietz A. - Fifht. Int. Congr. Biochem., 7, 85 (1963)
 121. Takaya T. y Miura K. - Archs. Int. Physiol. Biochem, 76, 603 (1968).
 122. Bade M.L. - J. Insect. Physiol., 10, 333 (1963).
 123. Sridhara S. y Bhat J.V. - Biochem. J., 91, 120 (1964)
 124. Lambremont E.N., Stein C.I. y Bennet A.F. - Comp. Biochem. Physiol., 16, 289 (1965).
 125. Keith A.D., Gauslaa G. y Anderson B.S. - Lipids, 2,

429 (1967).

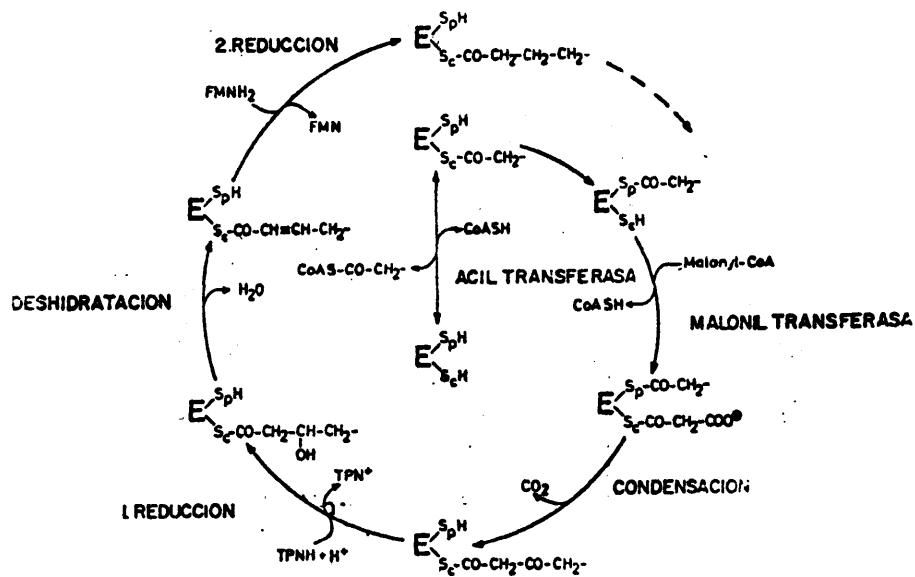
126. Nelson D.R. y Sukkestad D.R. - J. Insect. Physiol., 14, 293 (1968).
127. Stephen W.F. y Gilbert L.J. - J. Insect. Physiol., 14, 293 (1969).
128. Brak J.A.W., Vonk H.J. y Daniels J.A. - Archs. Int. Physiol. Chem., 74, 821 (1966).
129. Sridhara S., Rabi Rao U. y Bhat J.V. - Biochem. J., 98, 260 (1966).
130. Tietz A. y Stern N. - F.E.B.S. letters, 2, 286 (1969)
131. Kiyomoto R.K. y Keith A.D. - Lipids, 5, 617 (1970).
132. Erwin J. y Bloch K. - Science, 143, 1006 (1964).
133. Pearincott J.V. - J. Cell. comp. Physiol., 55, 167 (1960).
134. Lambremont E.N. y Graves J.B. - Comp. Biochem. Physiol., 30, 347 (1969).
135. Municio A.M., Odriozola J.M., Piñeiro A. y Ribera A. - Biochim. Biophys. Acta, 248, 212 (1971).
136. Municio A.M., Odriozola J.M. y Piñeiro A. - Comp. Biochem. Physiol., 37, 387 (1970).
137. Municio A.M., Odriozola J.M., Piñeiro A. y Ribera A. - Biochim. Biophys. Acta, 280, 248 (1972),
138. Municio A.M., Odriozola J.M., Pérez-Albarsanz M.A., Ramos J.A. y Relaño E. - Insect. Biochem., 4, 401 (1974).
139. Municio A.M., Odriozola J.M., Pérez-Albarsanz M.A. y Ramos J.A. - Biochim. Biophys. Acta, 360, 289 (1974).
140. Madariaga M.A., Mata F., Municio A.M. y Ribera A. - Insect. Biochem., 2, 249 (1972).
141. Odriozola J.M. - Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, pág. 125 (1972).
142. Hsu R.Y., Butterworth P.H.W. y Porter J.W. - Methods in Enzymology, XIV, 33 (1969).
143. Knoche H., Esders T.W., Kothe K. y Bloch K. - J. Biol. Chem., 248, 2317 (1973).

144. Flick P. y Bloch K. - J. Biol. Chem., 249, 1031 (1974).
145. Greenspan M.D., Birge C.H., Powell G., Hancock W.S. y Vagelos P.R. - Science, 170, 1203 (1970).
146. Ayling J.E., Pirson R. y Lynen F. - Biochemistry, 11, 526 (1972).
147. Smith S. y Dils R. - Biochim. Biophys. Acta, 116, 23 (1966).
148. Ilton M., Jevans A.W., McCarty E.D., Vance D., White H.B. III y Bloch K. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 87 (1971).
149. Smith S. y Abraham S. - J. Biol. Chem., 246, 6428 (1971).
150. Nandekar A.K.N. y Kumar S. - Arch. Biochem. Biophys., 134, 563 (1969).
151. Lin C.Y. y Kumar S. - J. Biol. Chem., 246, 3284 (1971).
152. Smith S. y Abraham S. - J. Biol. Chem., 246, 2537 (1971).
153. Lin C.Y. y Kumar S. - J. Biol. Chem., 247, 604 (1972).
154. Carey E.M., Hansen H.J.M. y Dils R. - Biochim. Biophys. Acta, 260, 527 (1972).
155. Sirevag R. y Levine R.P. - J. Biol. Chem., 247, 2586 (1972).
156. Roncari D.A.K. - Can. J. Biochem., 52, 221 (1974).
157. Dutler H., Coon M.J., Kull A., Vogel H., Waldvogel G. y Prelog V. - Eur. J. Biochem., 22, 203 (1971).
158. Burton O.N., Haavik A.G. y Porter J.W. - Arch. Biochem. Biophys., 126, 141 (1968).
159. Knudsen J. - Biochim. Biophys. Acta, 280, 408 (1972).
160. Carey E.M. y Dils R. - Biochim. Biophys. Acta, 306, 156 (1973).
161. Volpe J.J. y Vagelos P.R. - Biochim. Biophys. Acta, 326, 293 (1973).
162. Strong C.R. y Dils R. - Int. J. Biochem., 3, 369 (1972).

163. Goldberg J. y Bloch K. - J. Biol. Chem., 247, 7349 (1972).
164. Di Nello R.K. y Ernst-Fonberg M.L. - J. Biol. Chem., 248, 1707 (1973).
165. Volpe J.J., Lyler T.O., Roncari A.K. y Vagelos P.R. - J. Biol. Chem., 248, 2502 (1973).
166. Ryder E. - Biochem. J., 119, 929 (1970).
167. Knoche H.W. y Koths K.E. - J. Biol. Chem., 248, 3517 (1973).
168. Lornitzo F.A., Qureshi A.A. y Porter J.W. - J. Biol. Chem., 249, 1654 (1974).
169. White H.B., Mitsuhashi O. y Bloch K. - J. Biol. Chem., 246, 4751 (1971).
170. Kühn L., Castorph H. y Schweizer E. - Eur. J. Biochem., 24, 492 (1972).
171. Schweizer E., Kniep B., Castorph H. y Holzner U. - Eur. J. Biochem., 39, 353 (1973).
172. Tauro P., Holzner U., Castorph H., Hill F. y Schweizer E. - Molec. gen. Genet., 129, 131 (1974).
173. Donaldson W.E. y Mueller N.S. - Can. J. Biochem., 49, 563 (1971).
174. Municio A.M., Odriozola J.M. y Ramos J.A. - Insect. Biochem., 3, 359 (1973).
175. Castro J., Municio A.M., Odriozola J.M., Pérez Albarsanz M.A. y Ramos J.A. - Int. J. Biochem., 5, 561 (1974).
176. Hilton H.E. - Advan. Insect. Physiol. "Acad. Press", 5, 68 (1968).
177. Keilin B. y Hartree E. - Proc. R. Soc. B., 124, 397 (1938).
178. Beaven G.H. y Holiday E.R. - Adv. Prot. Chem., 7, 319 (1952).
179. Edelhoch H. - Biochemistry, 6, 1948 (1967).
180. Metcalfe L.E. y Schmitz A.A. - Anal. Chem., 33, 363 (1961).

181. Thompson S.N. - Comp. Biochem. Physiol., 45B, 467 (1973).
182. Law S.W.T. y Burton D.N. - Can. J. Biochem., 51, 241 (1973).
183. Dimroth P., Greull G., Seyffert R., Lynen F. - Hoppe Seylles Z. - Physiol. Chem., 353, 126 (1972).
184. Roncari D.A.K. - J. Biol. Chem., 249, 7035 (1974).
185. Brilton Chance - Methods in Enzymology IV, 273 (Colowick S.P. y Kaplan N.O. - Eds. New York, Academic Press) (1957).
186. Moore S. - J. Biol. Chem., 238, 235 (1963).
187. Hirs C.H.W. - Methods in Enzymology, 11, 197 (1967) Ed. by J.M. Lowenstein. Academic Press: New York.
188. Seubert W. y Podack E.R. - Molecular and cellular Biochemistry, 1, 29 (1973).
189. De Duve C., Pressmann B.C., Gianetto R., Watiaux R. y Appelmans F. - Biochem. J., 60, 604 (1955).
190. Schmidt H.U. - Methoden der enzymatischen analyse. Verlag chemie. Weinheim. Bergstrasse, pg. 752 (1962).
191. Emery A.E.H. - J. Neurol. Sci., 7, 137 (1968).
192. Wit-Peeters E.M. - Biochim. Biophys. Acta, 176, 453 (1969).
193. Lo ry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. - J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
194. Cleland K.W. y Slater E. - Biochem. J., 53, 547 (1953).
195. Beisenherz G., Boltze H.J., Buecher T., Czuk R., Garbade K.H., Meyer-Ahrendt E. y Pfeleiderer G. - Z. Naturforsch, 8b, 555 (1953).
196. Bailey J.L. - Techniques in protein chemistry pg. 340, (1967), 2^{dn} Ed., Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
197. Davis B.J. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964).
198. Ellman G.L. - Arch. Biochem. Biophys, 82, 70 (1959).
199. Wilson A.C. y Williamson J.P. - Biochem. J., 117 26P (1970).

6. FIGURAS



REACCION FINAL : PALMITOIL TRANSFERASA

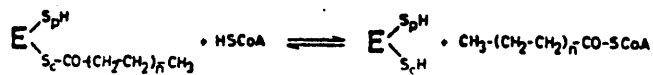


Fig. 1

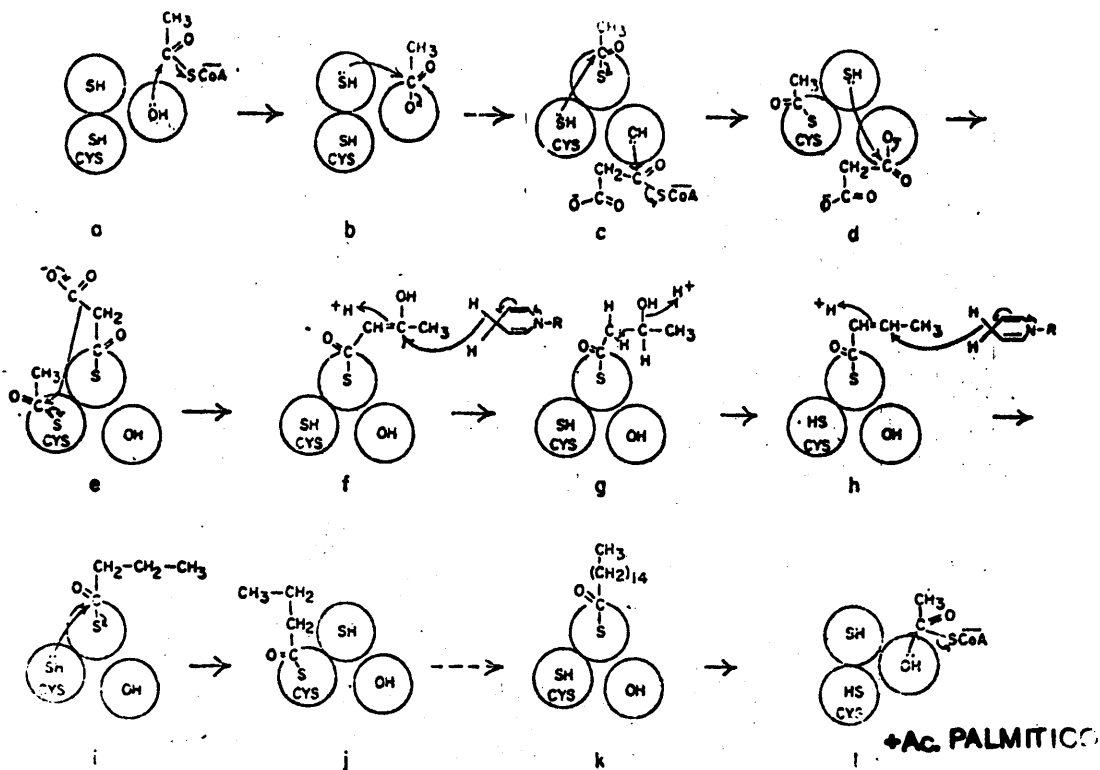


Fig-2

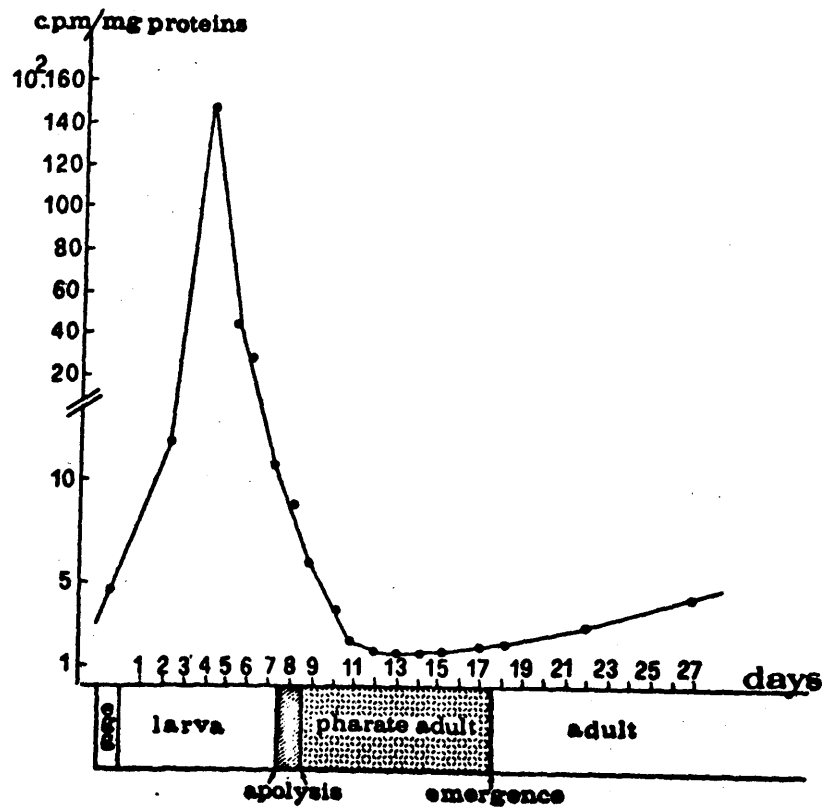


Fig. 3

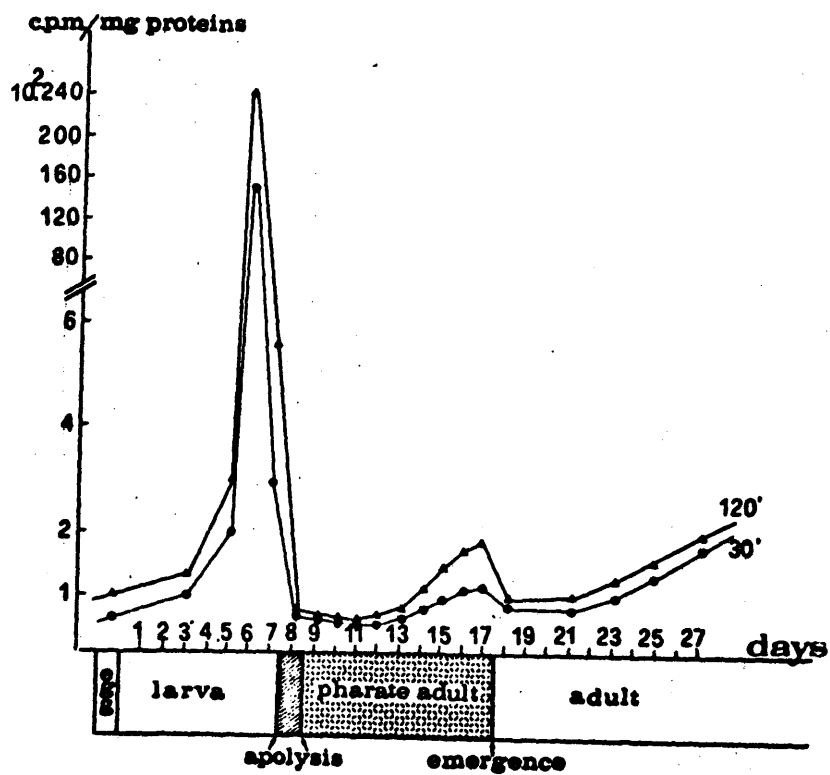


Fig. 4

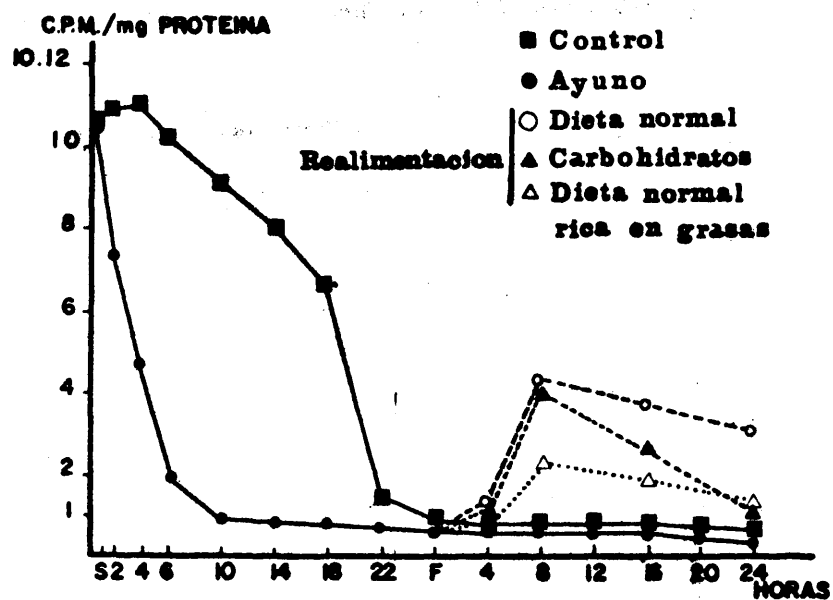


Fig. 5

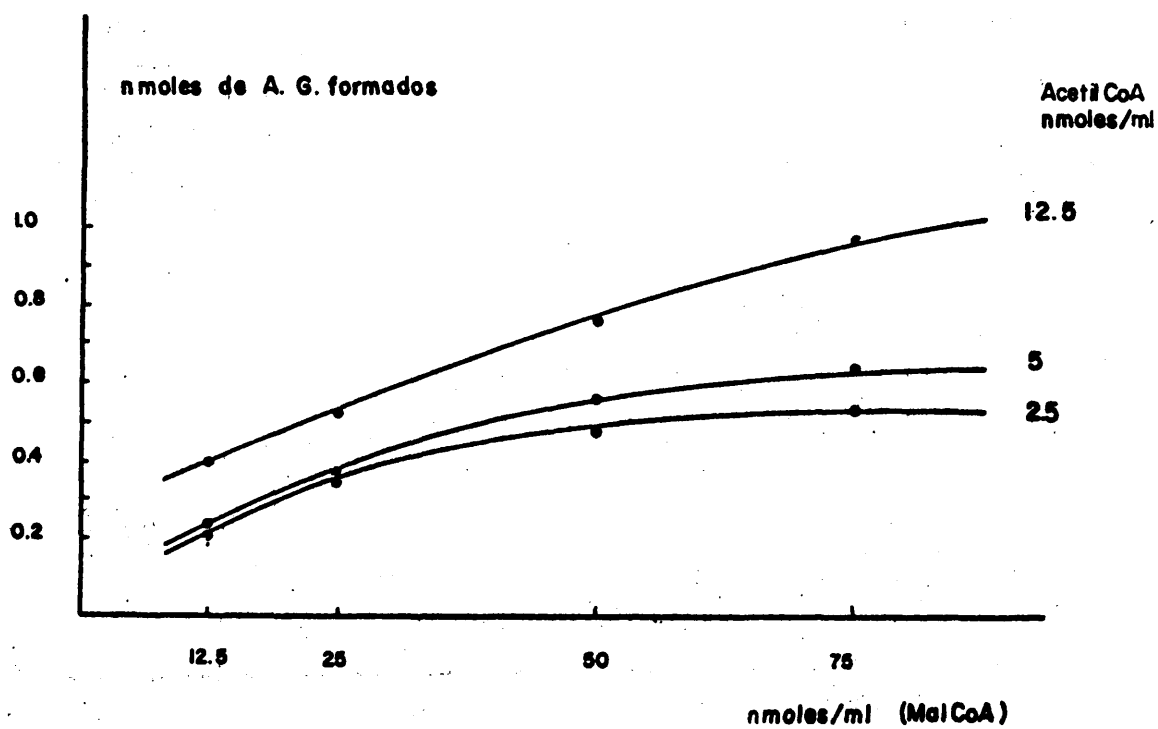
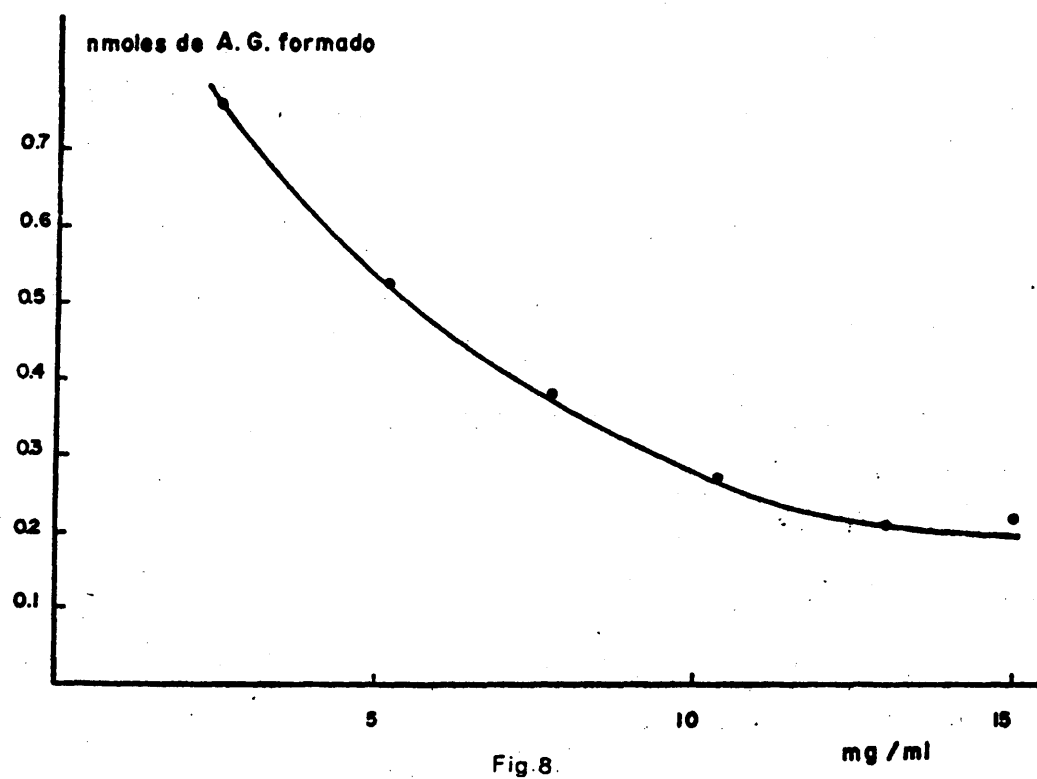
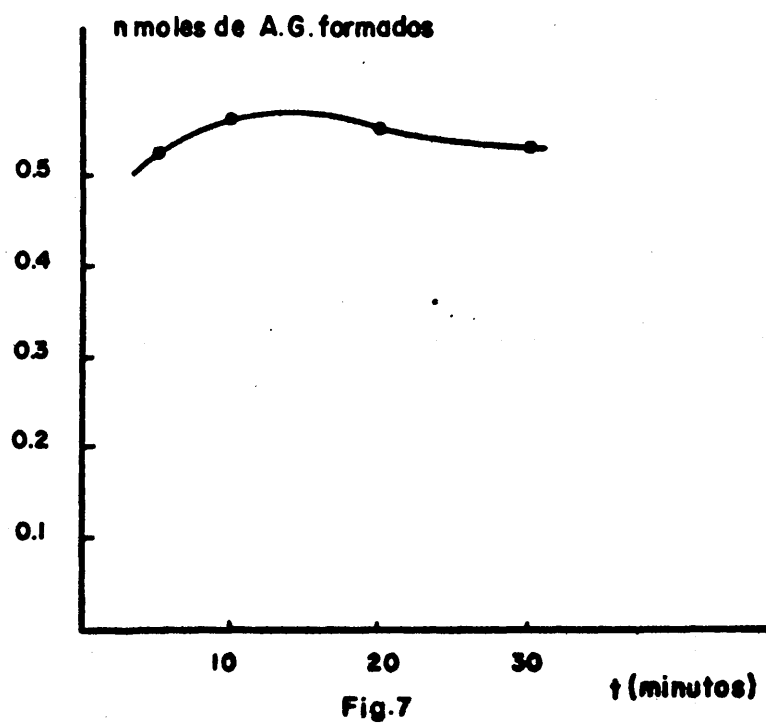
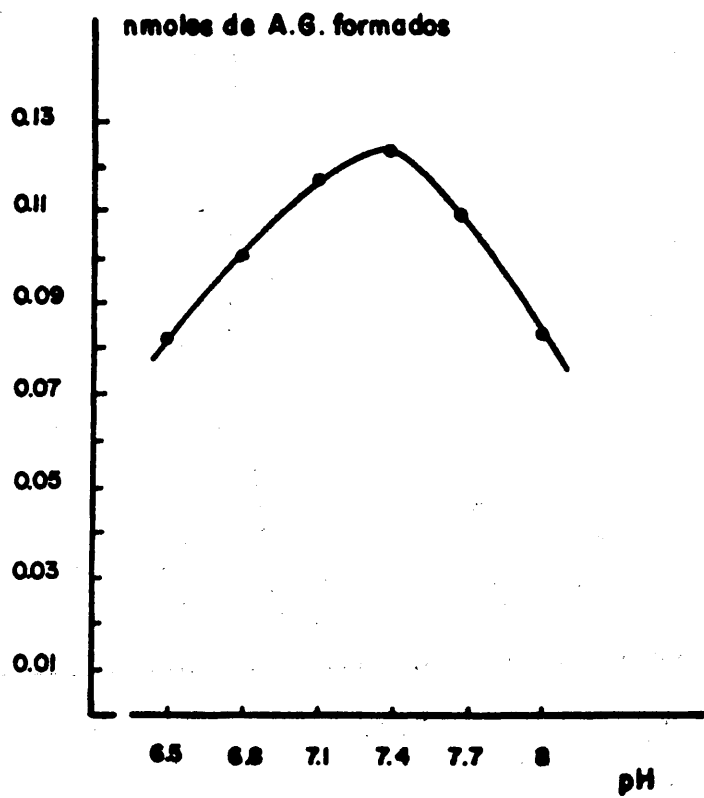
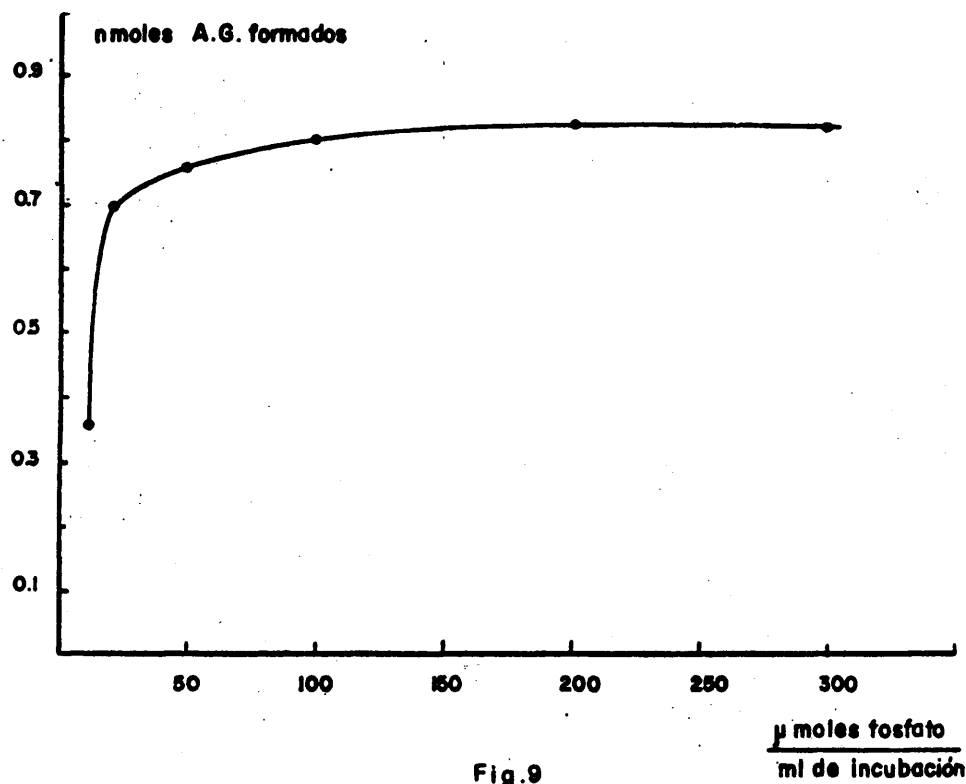


Fig. 6





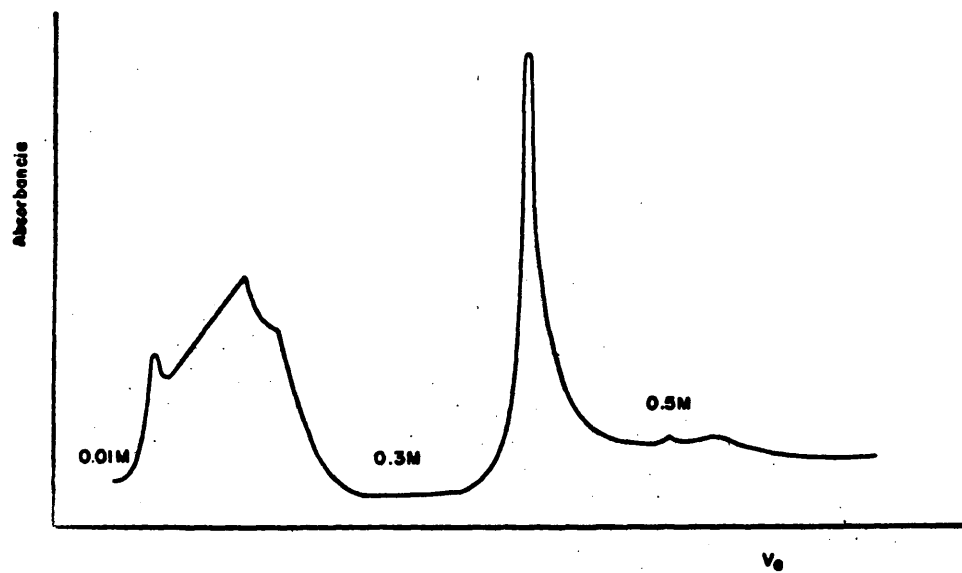


Fig.15

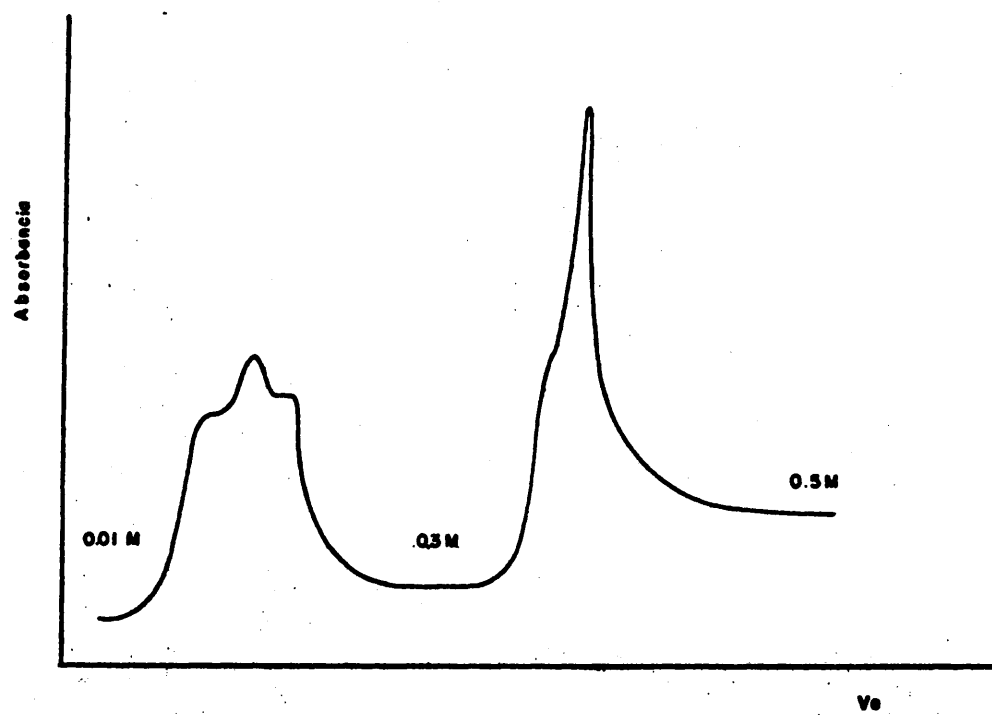


Fig.16

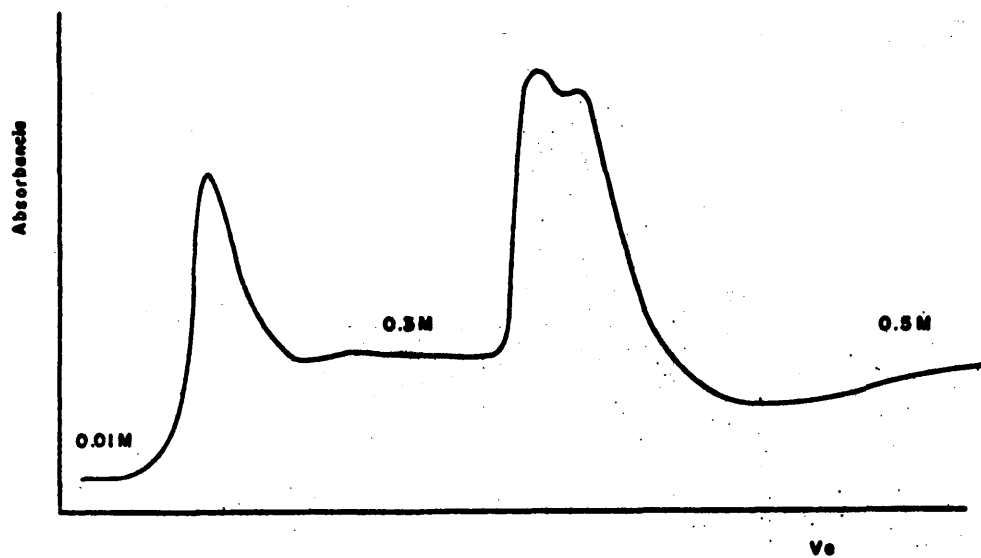


Fig. 17

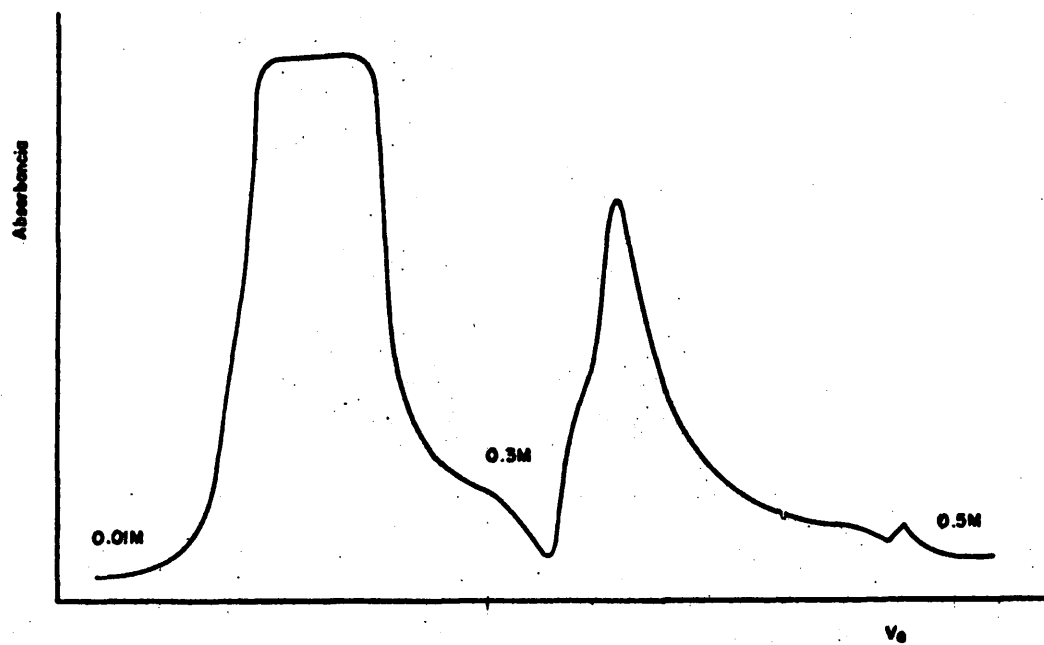


Fig. 18

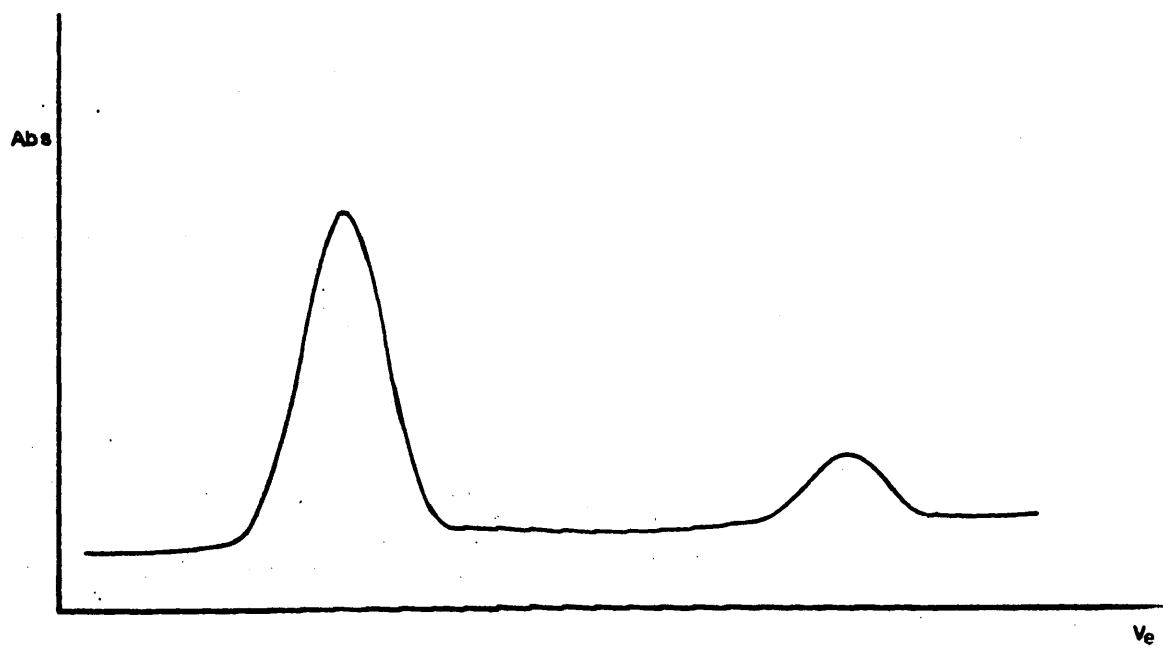


Fig.19

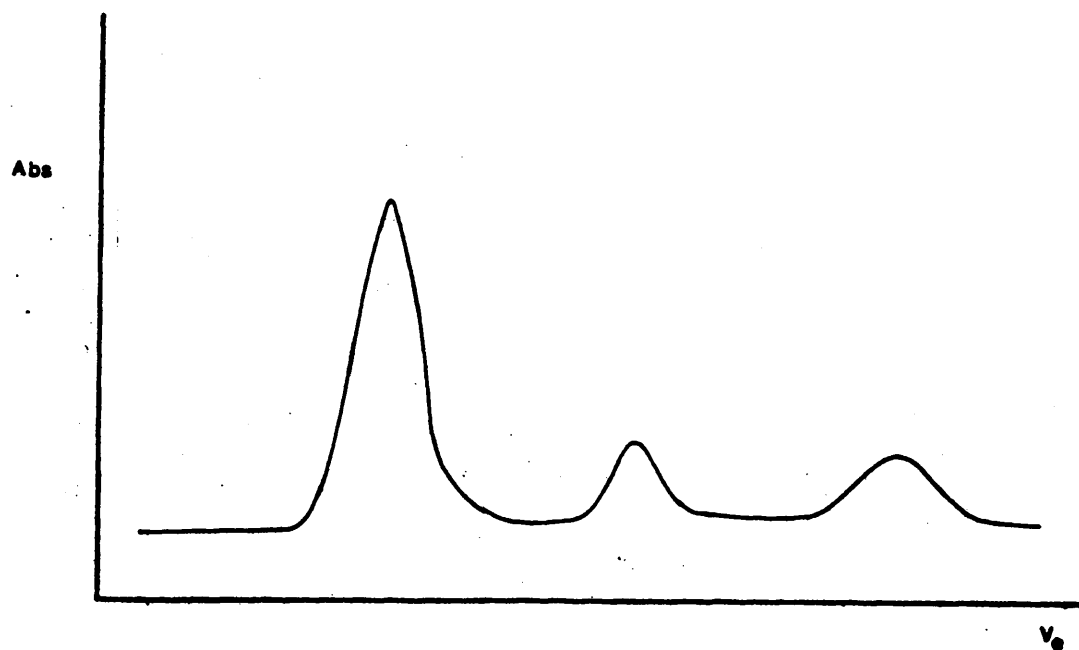


Fig.20

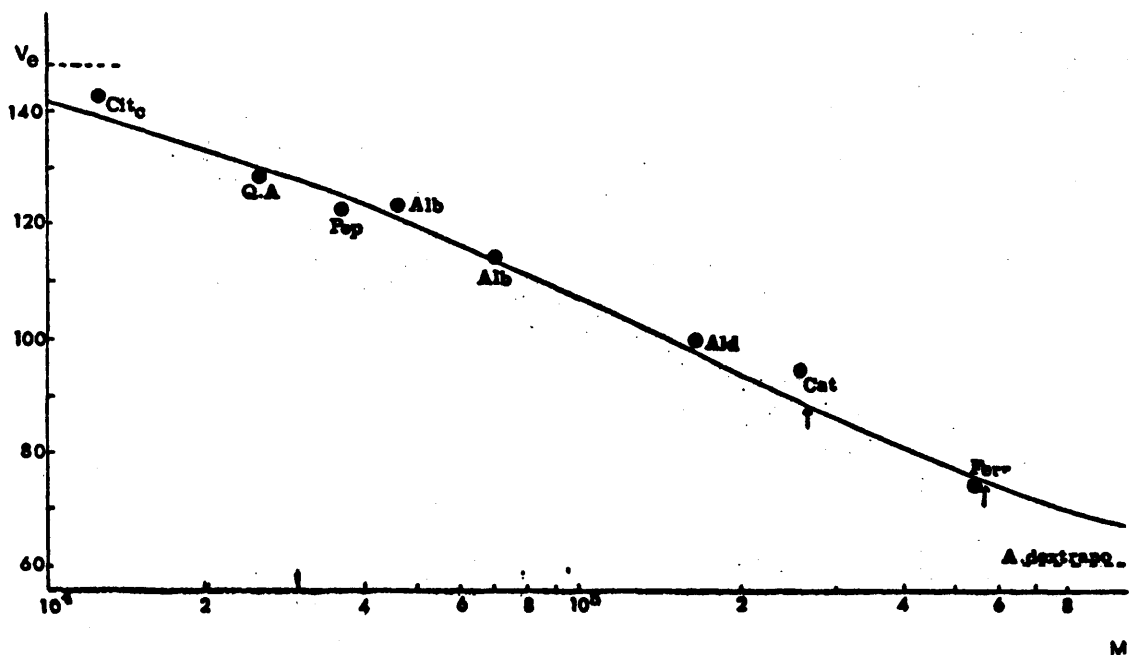


Fig. 21

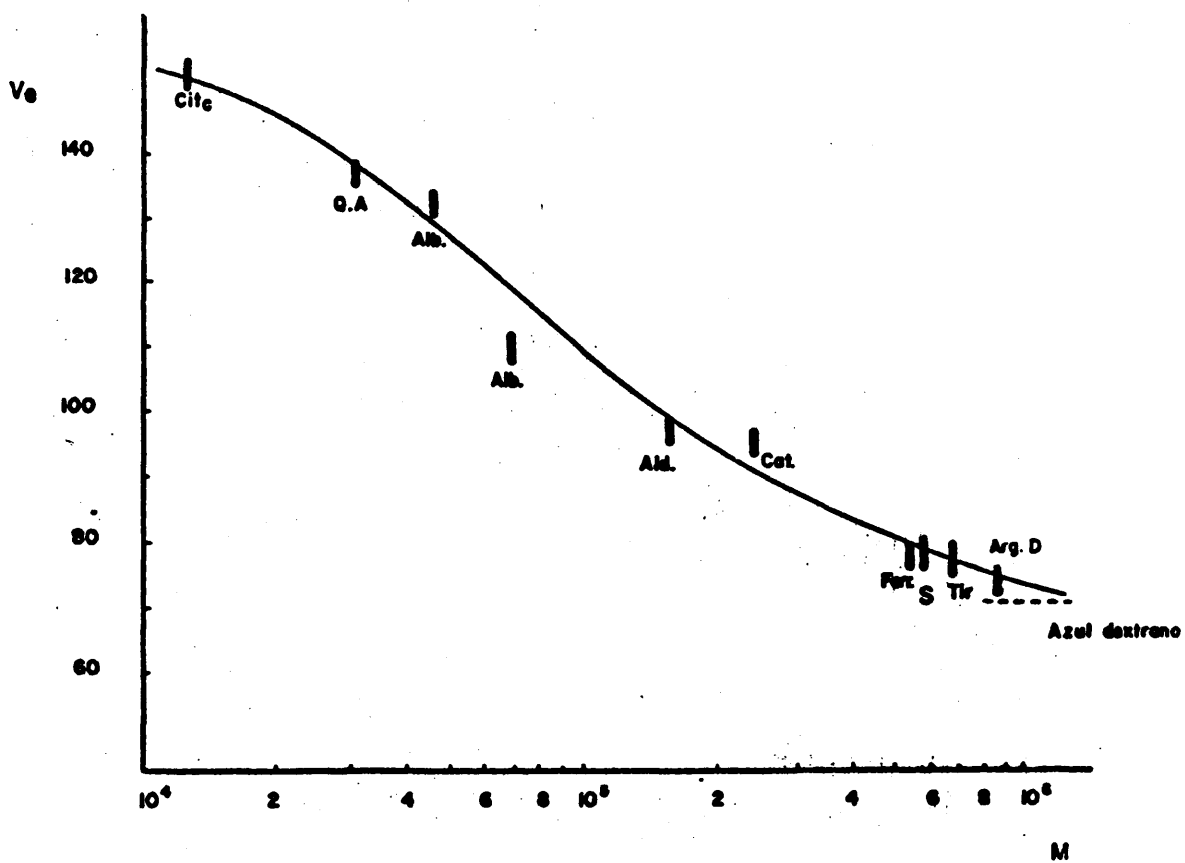


Fig. 22

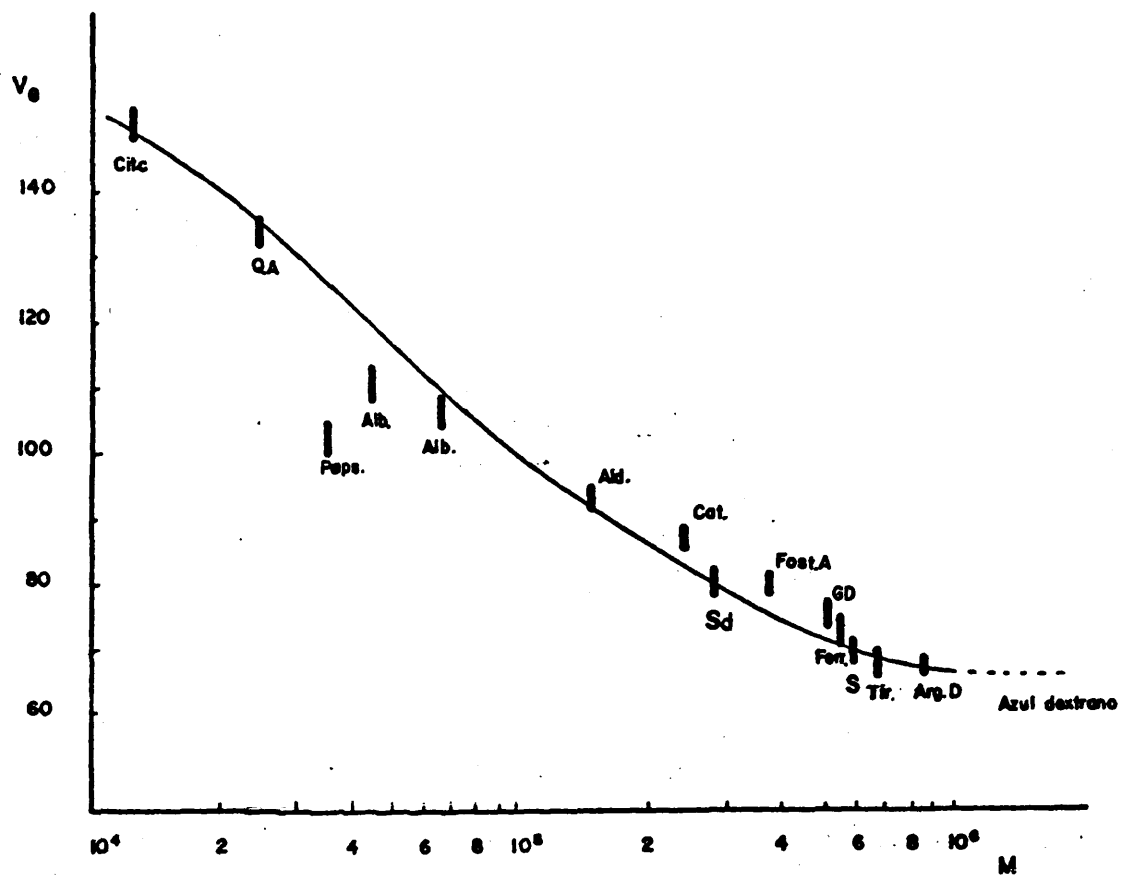
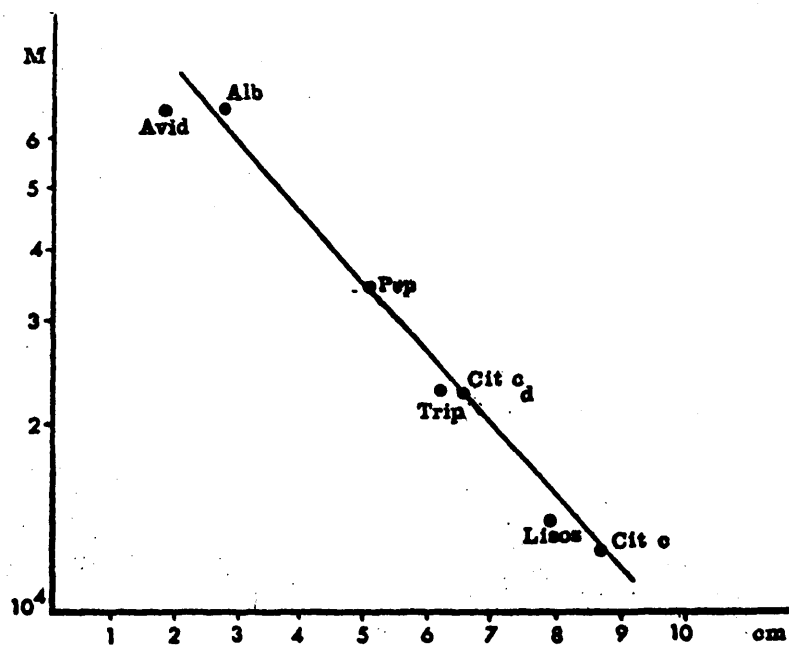


Fig. 23



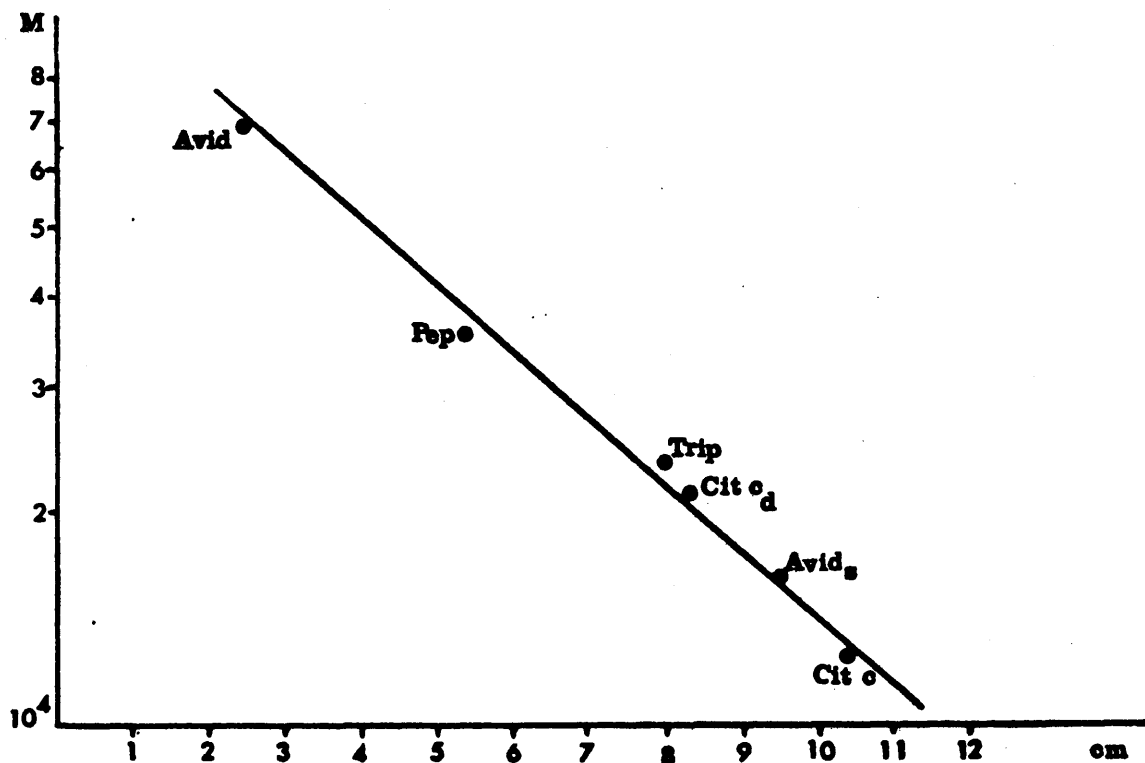


Fig. 25

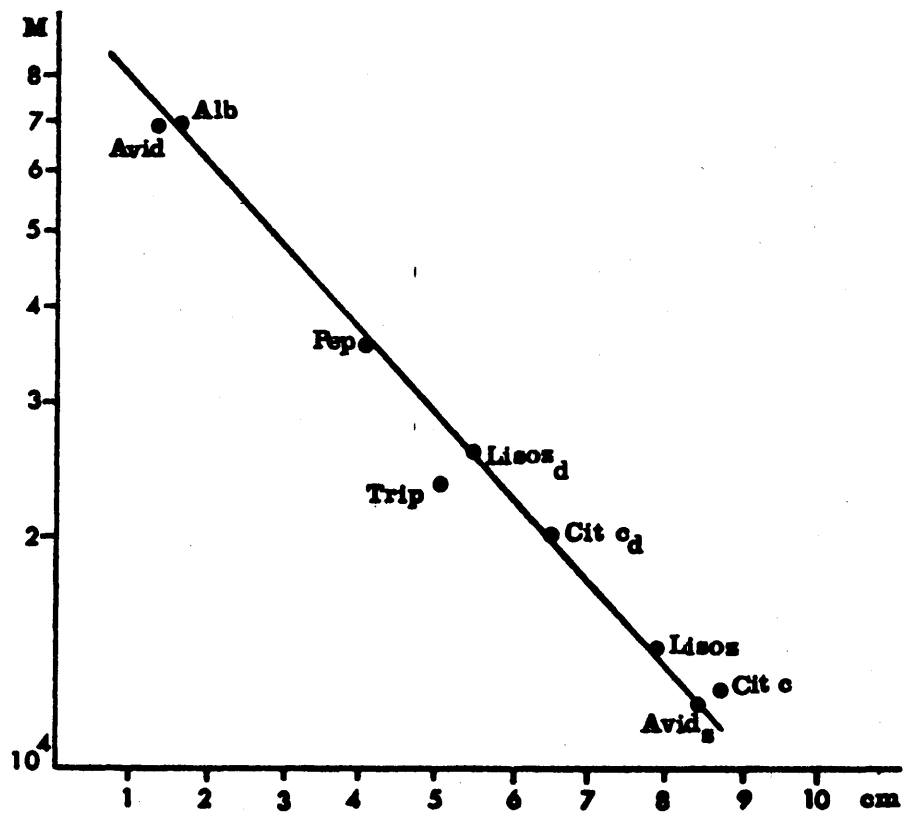


Fig. 26

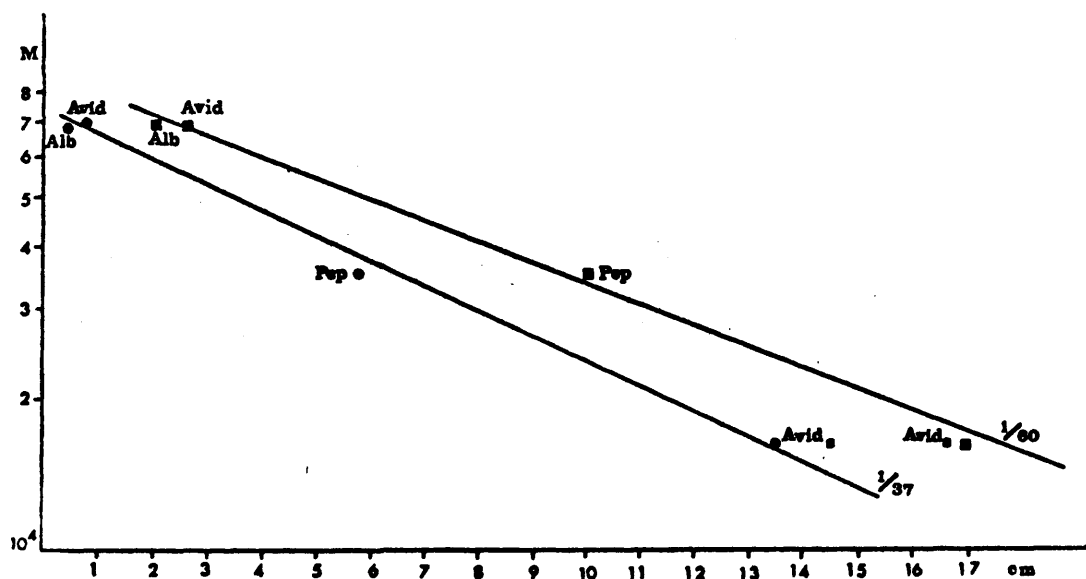


Fig. 27

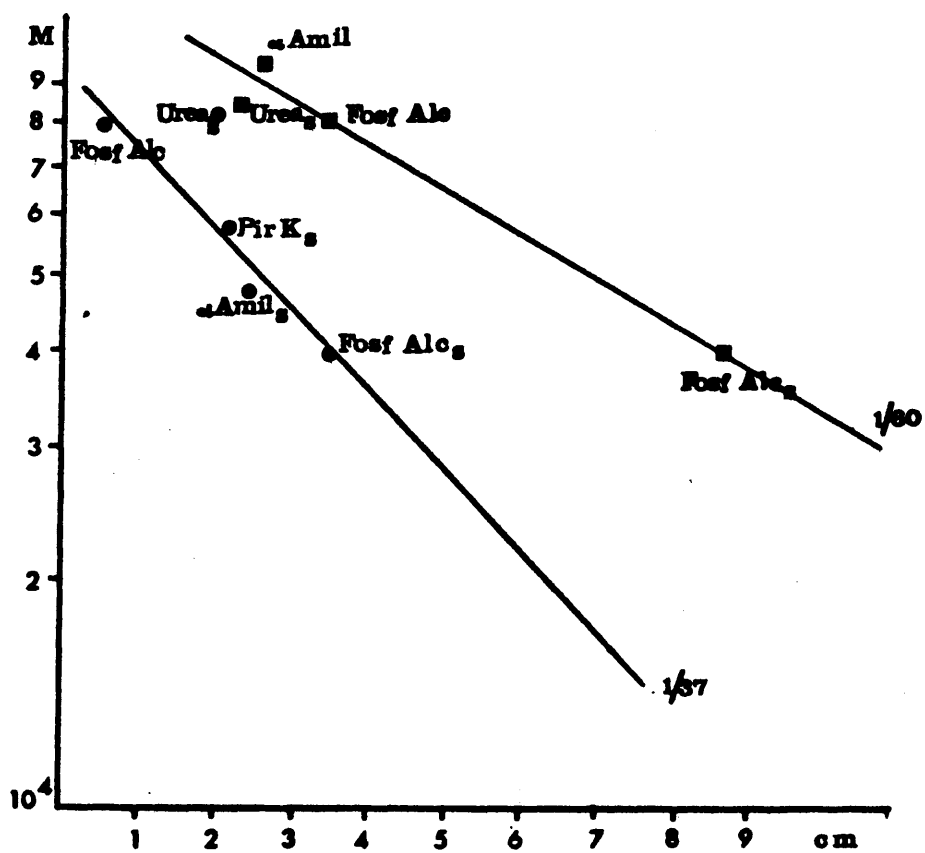


Fig. 28

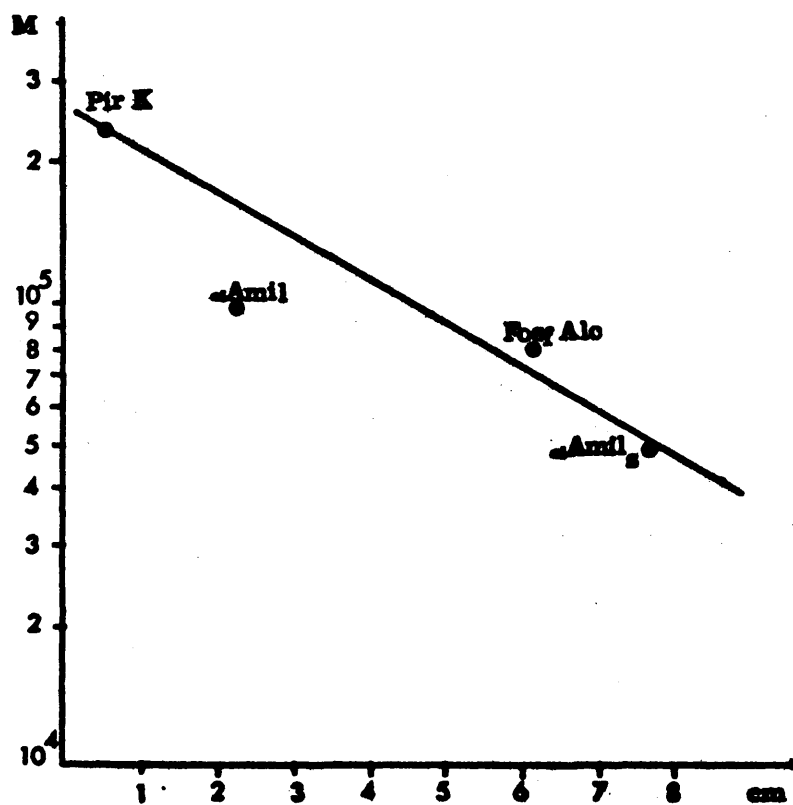


Fig-29

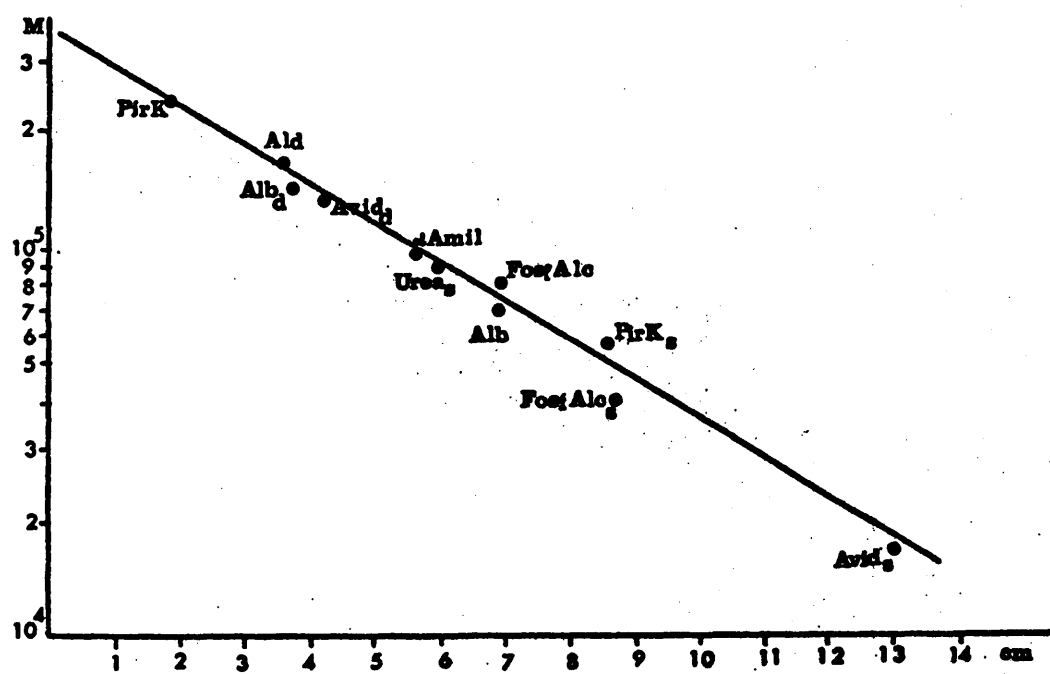


Fig-30

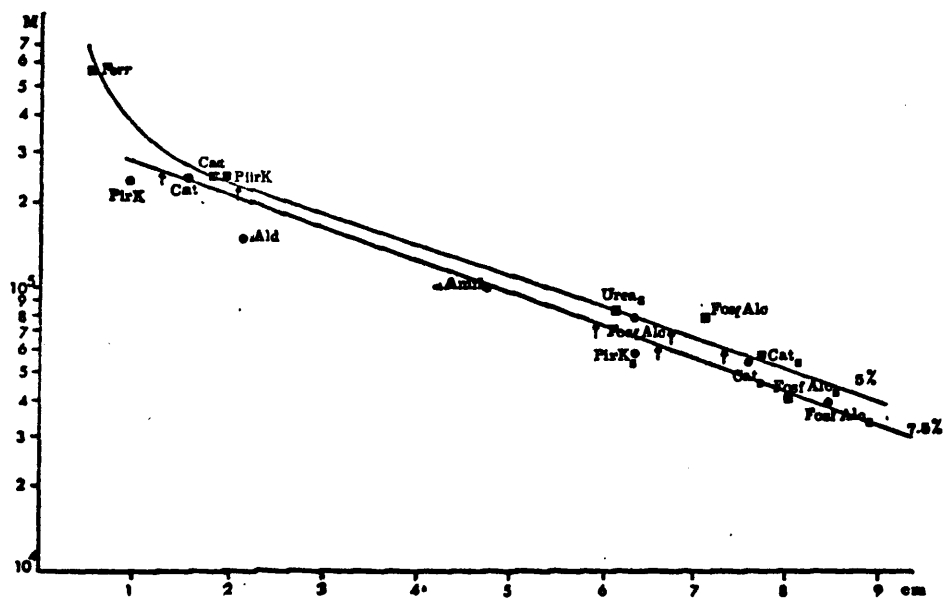


Fig. 31

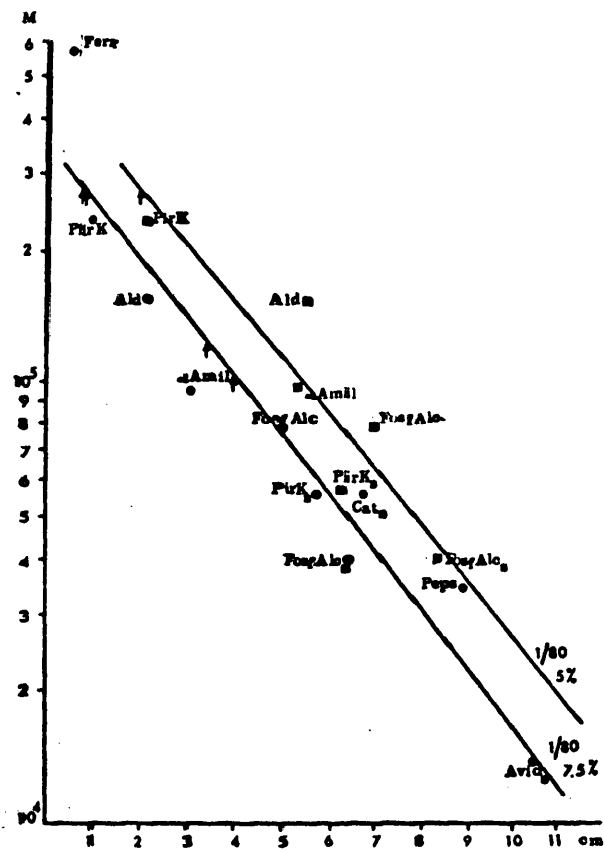


Fig. 32

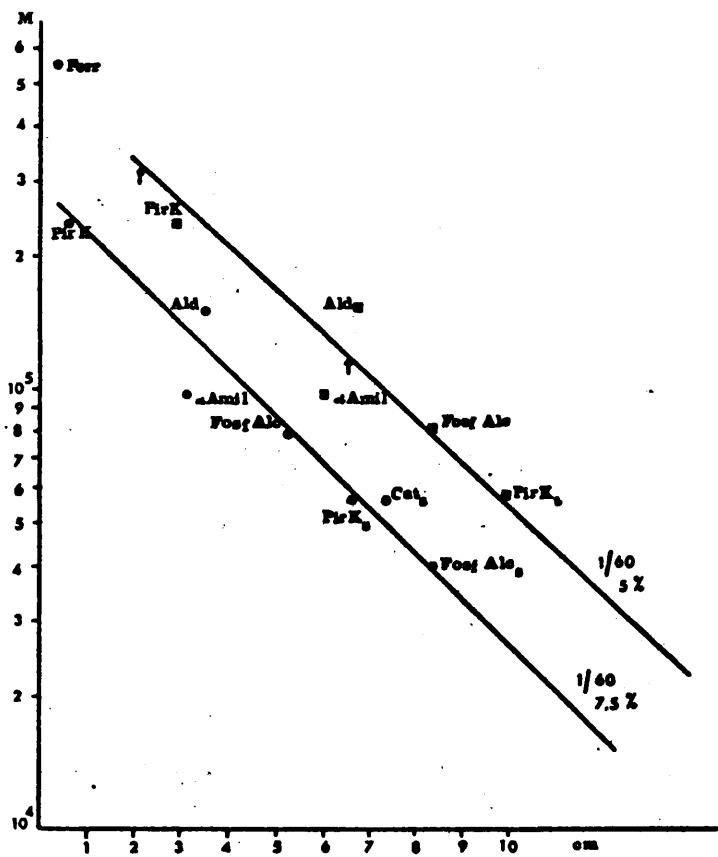


Fig. 33

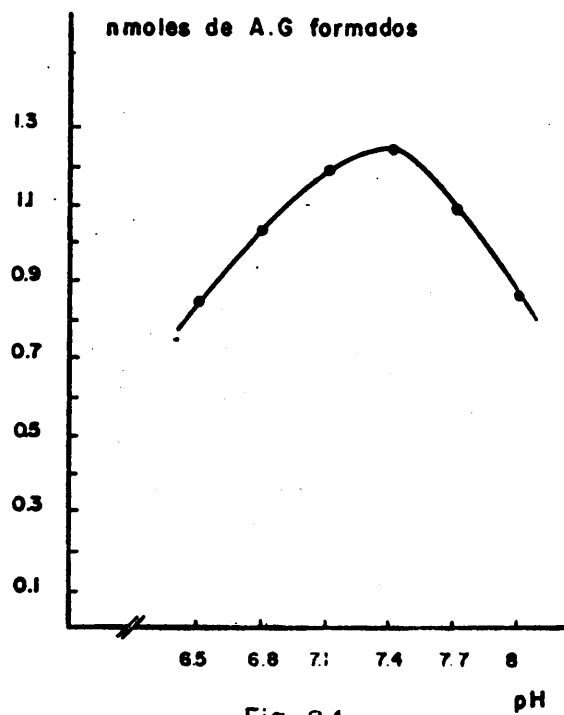


Fig. 34

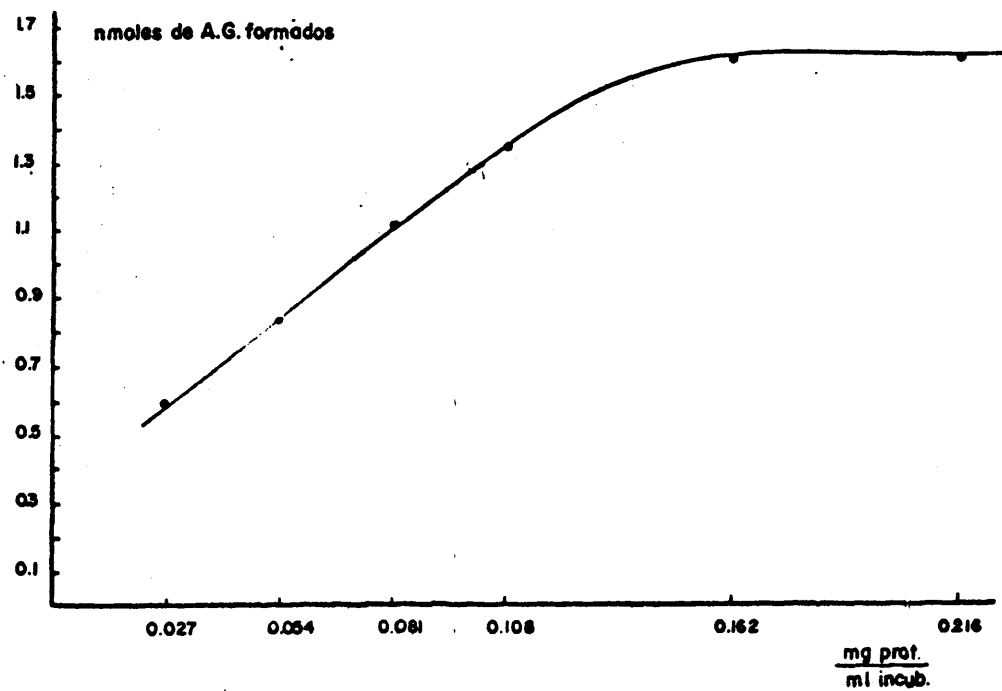


Fig-35

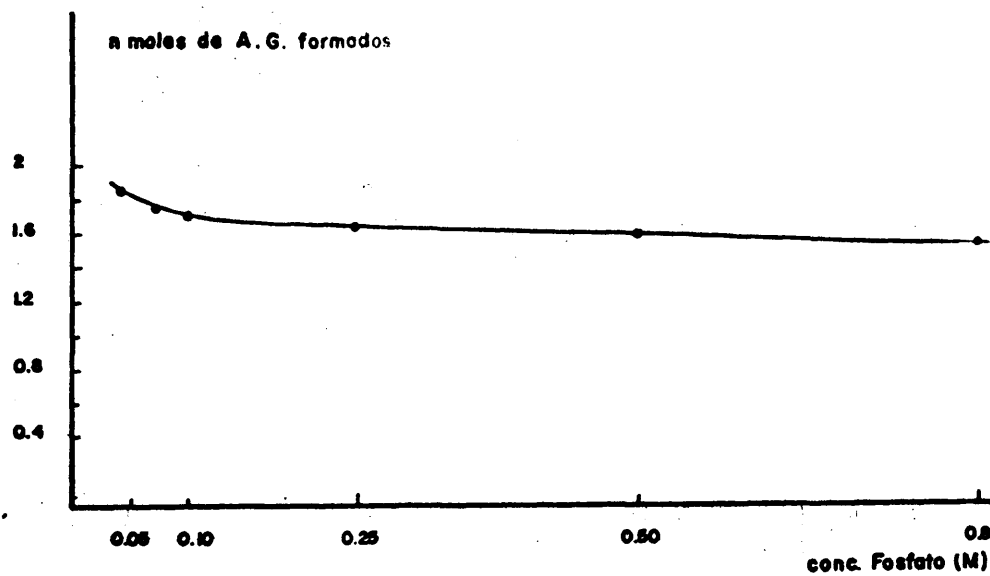


Fig-36

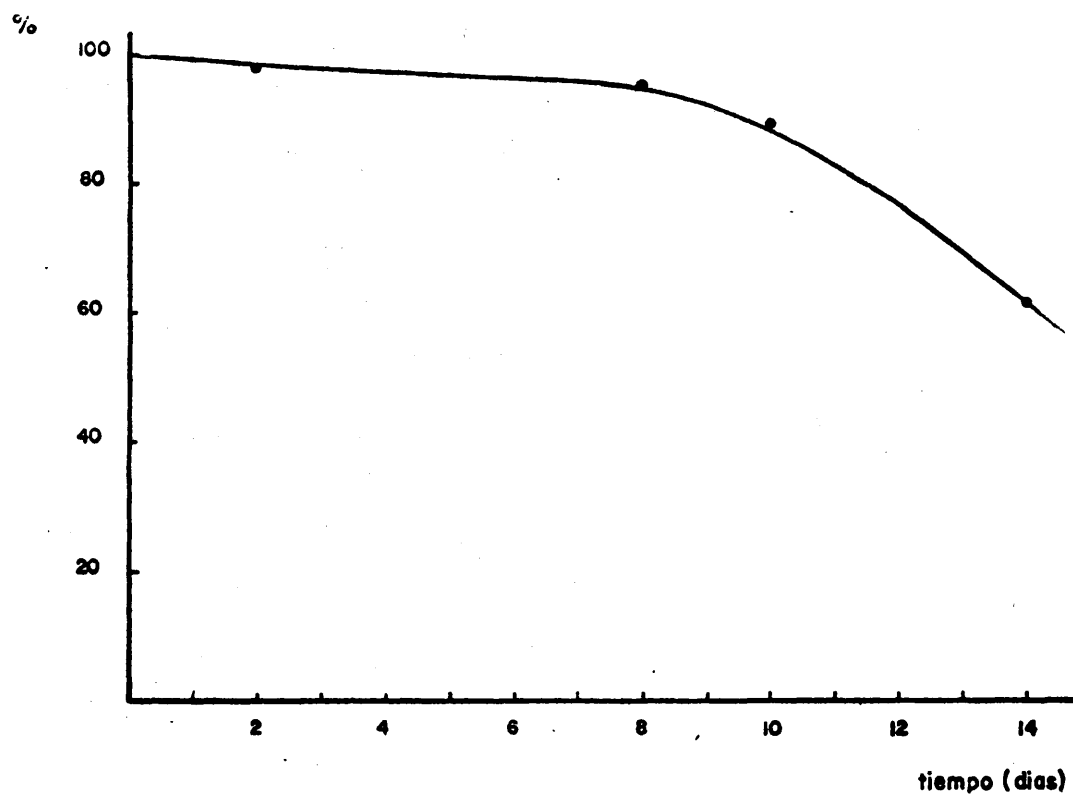


Fig-37

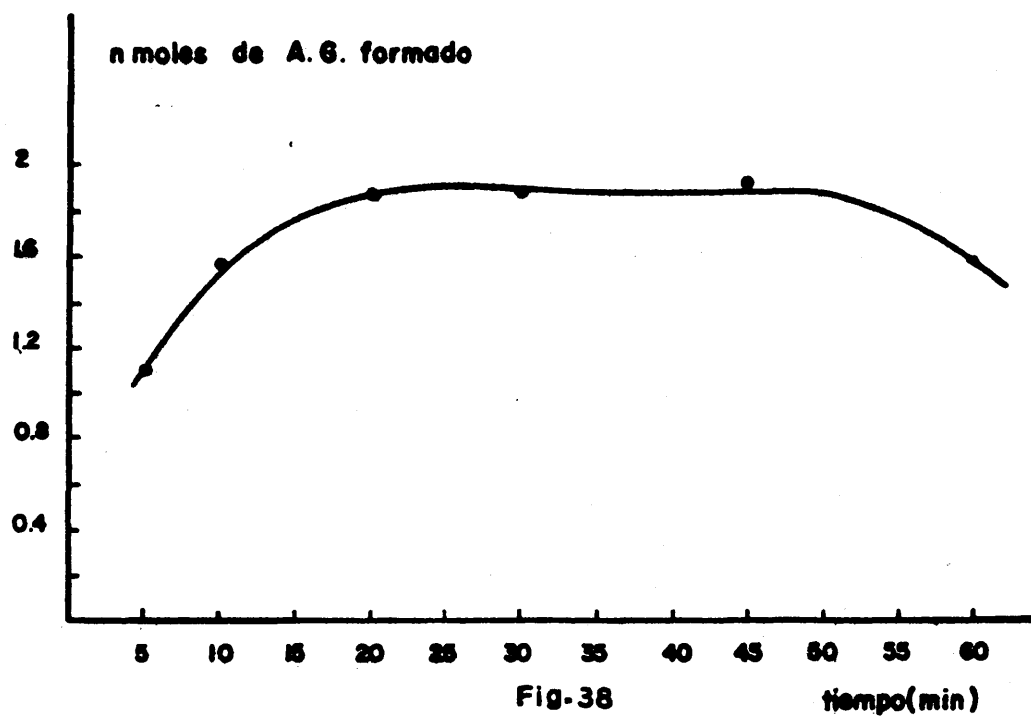


Fig-38

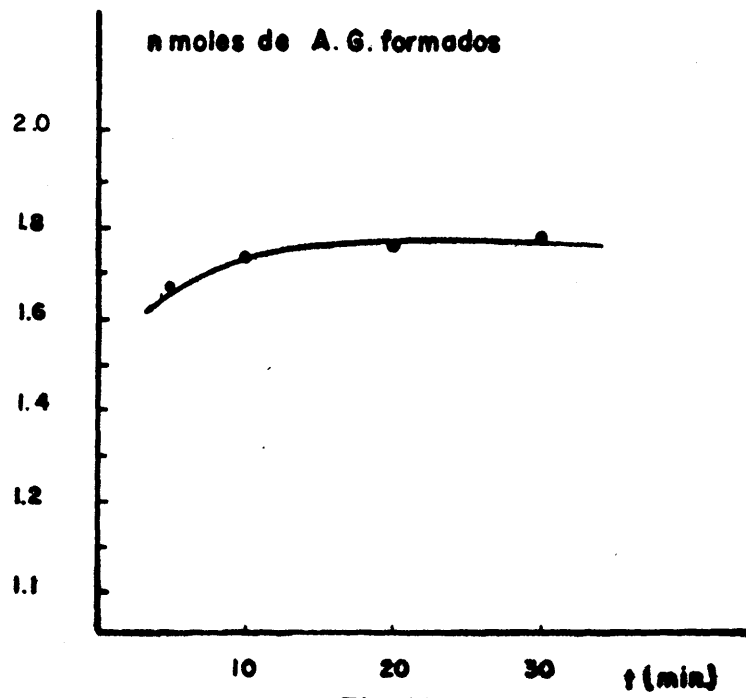


Fig-39

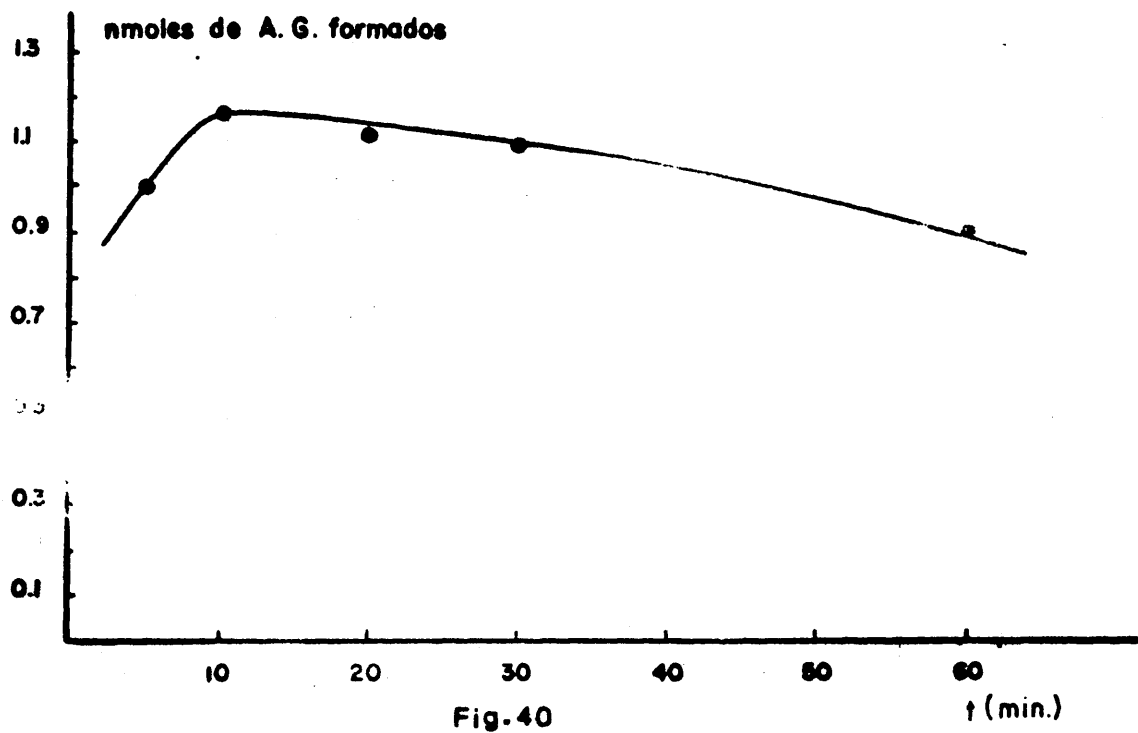


Fig-40

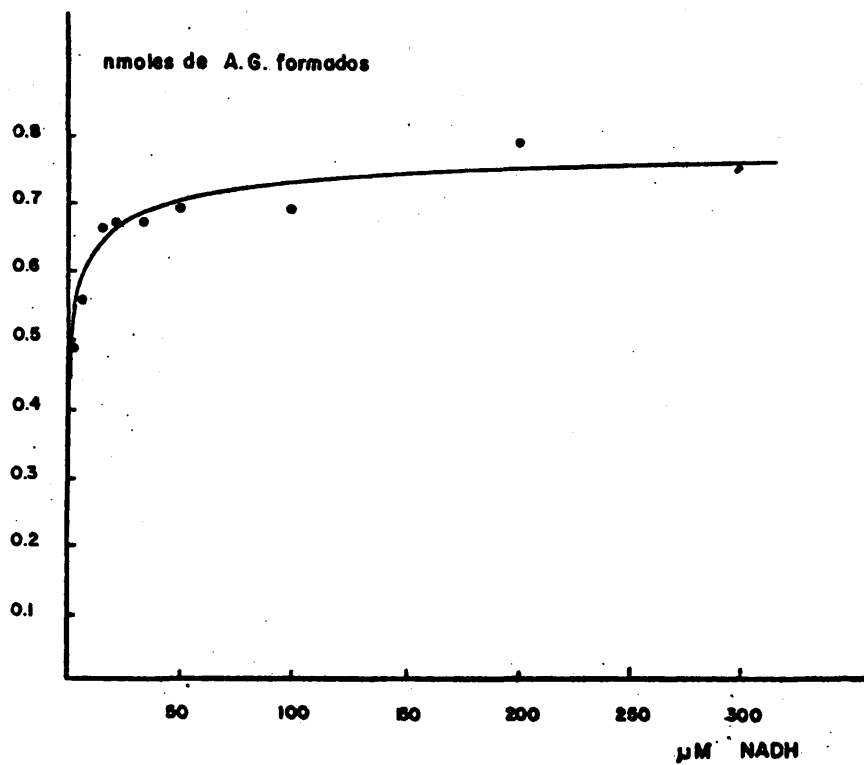


Fig. 41

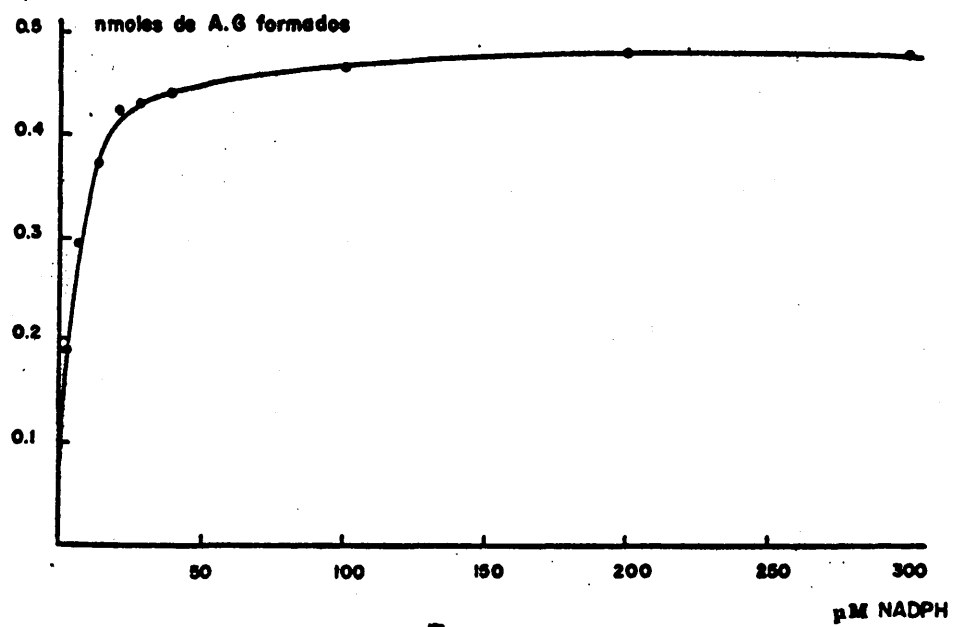


Fig-42

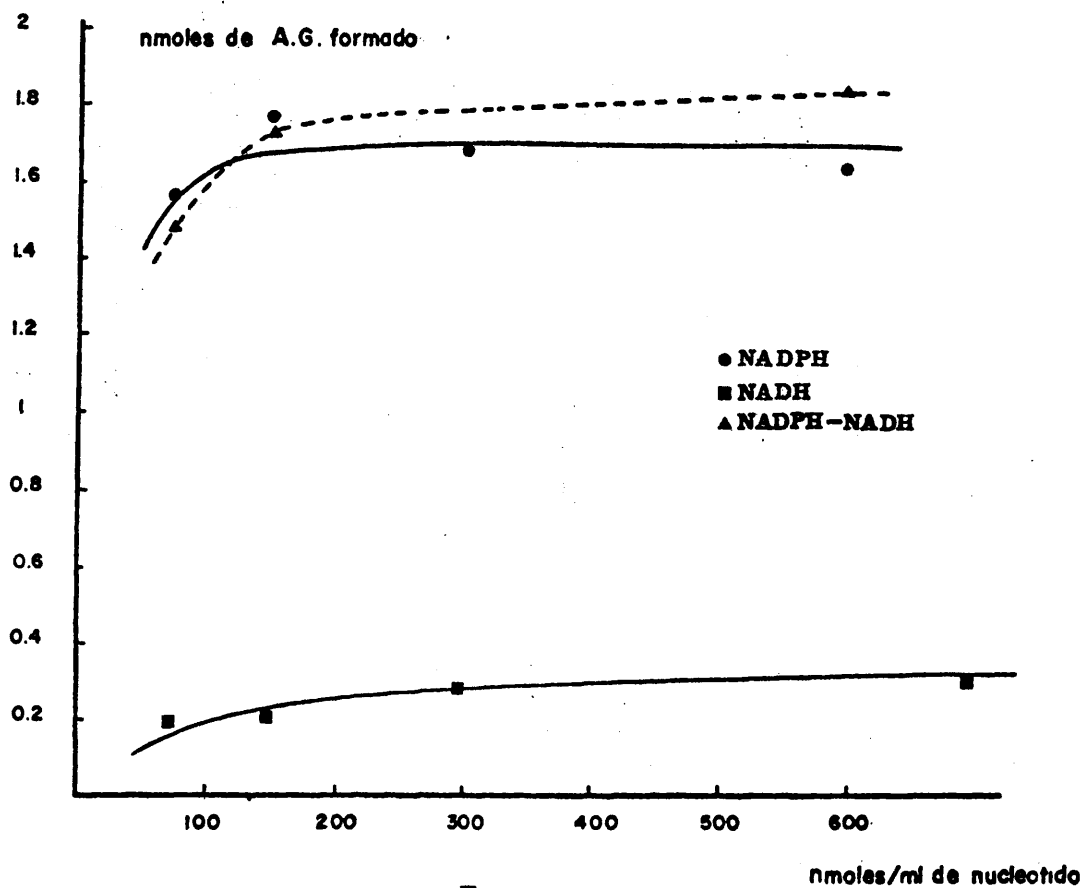


Fig-43

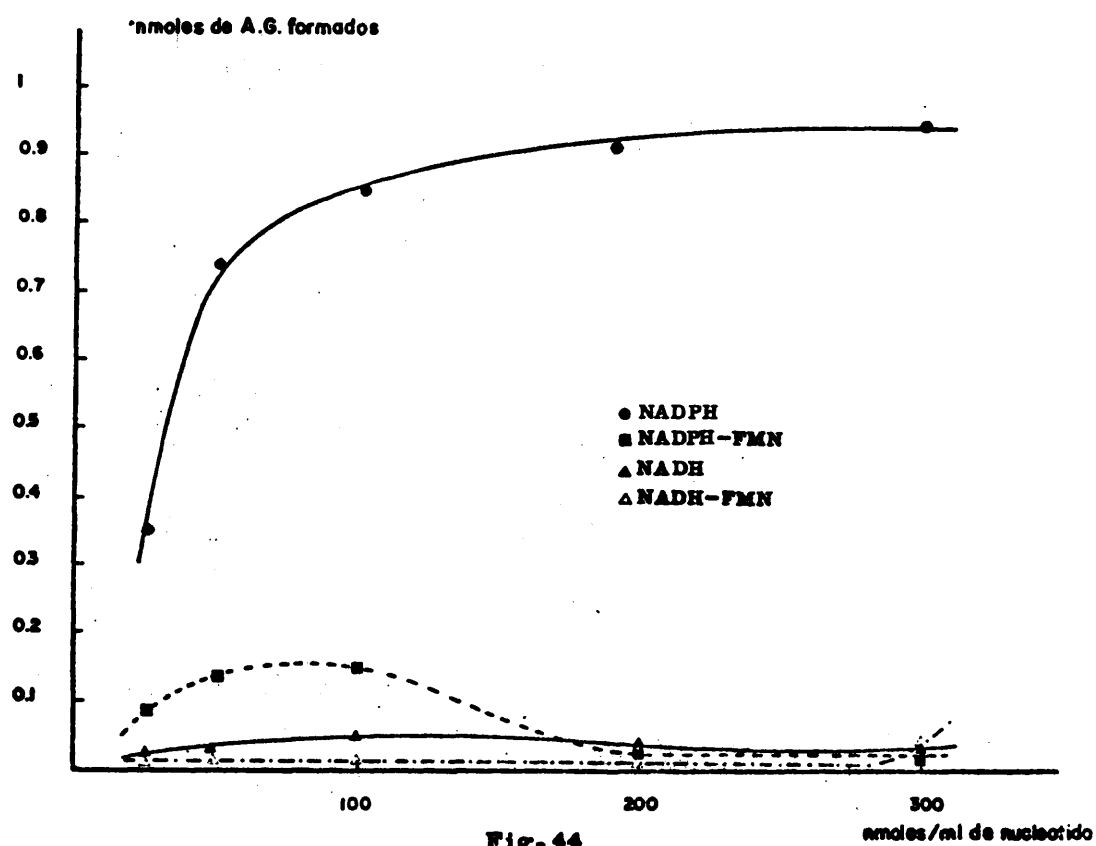


Fig-44

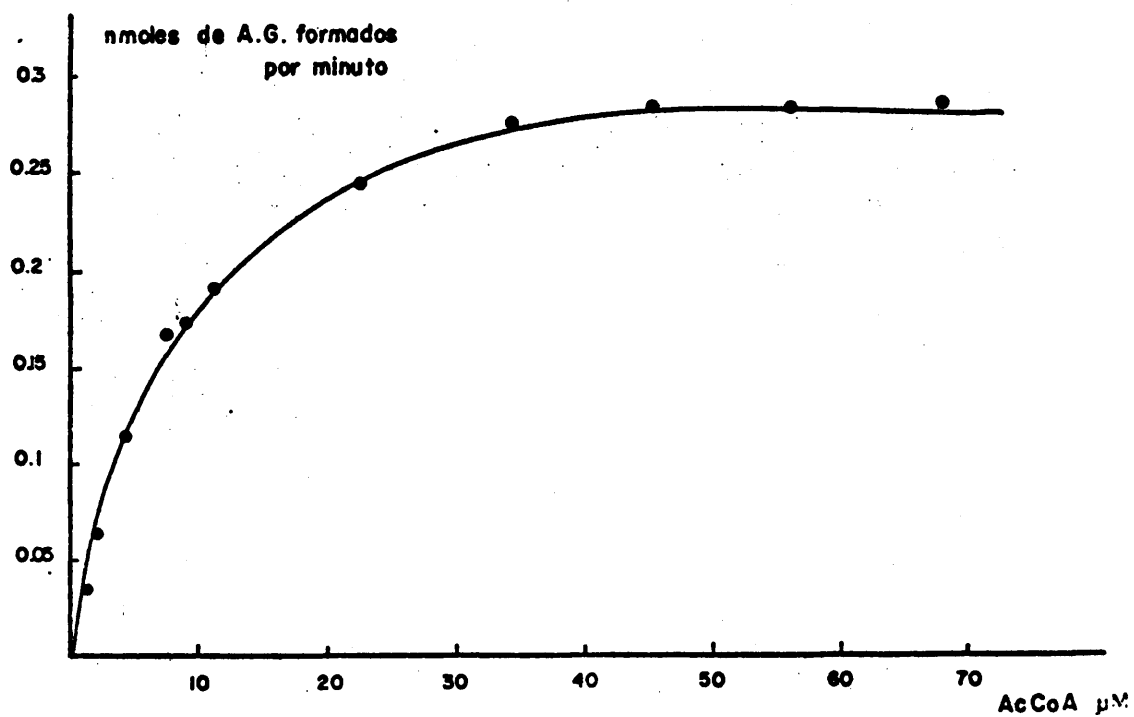


Fig-45

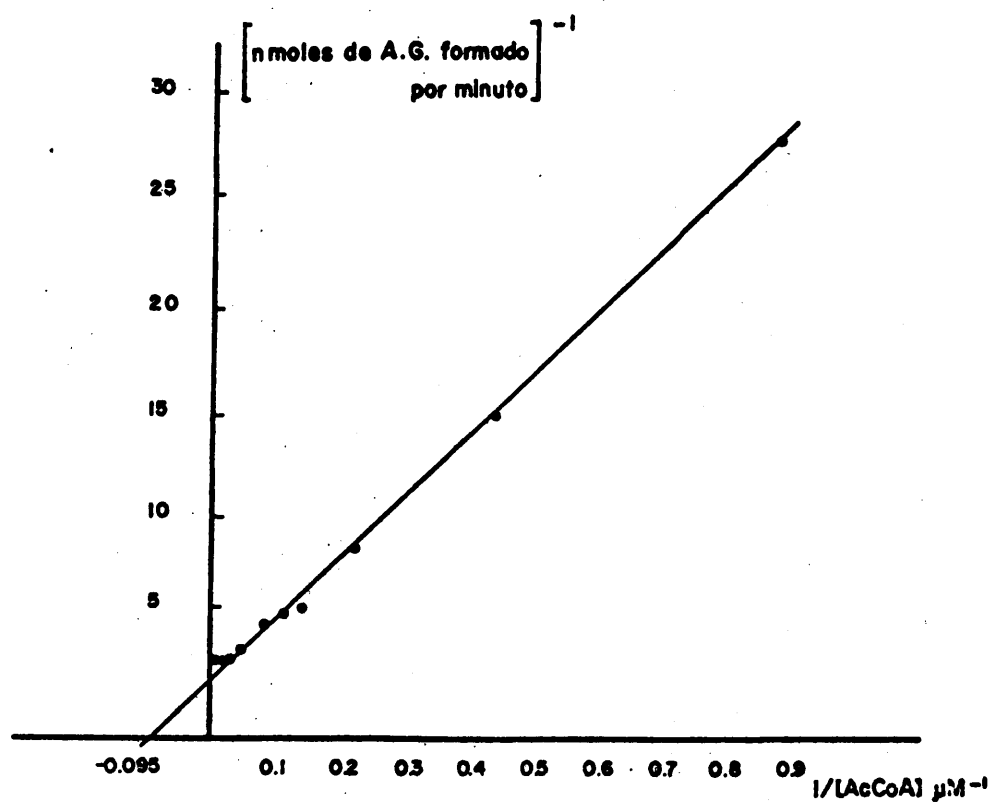


Fig-46

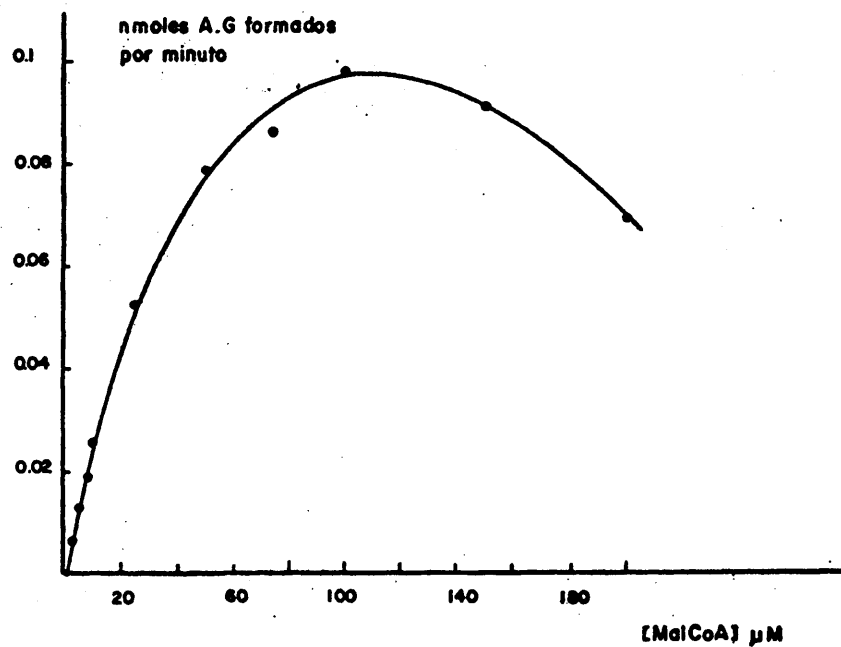


Fig. 47

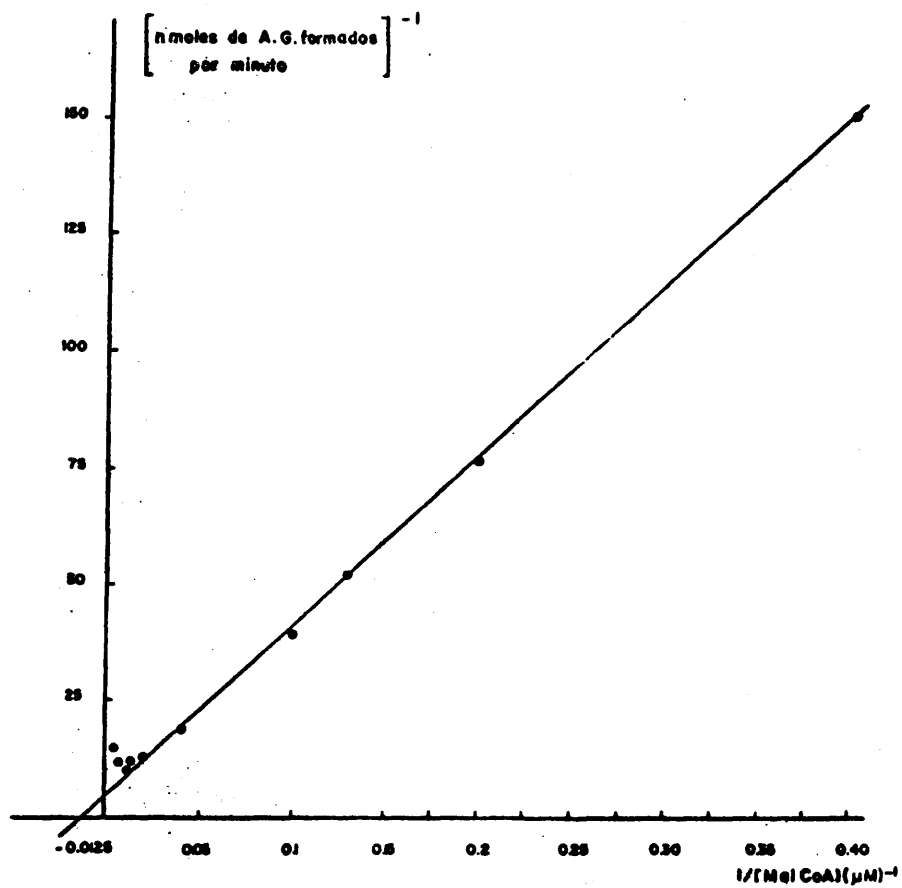


Fig. 48

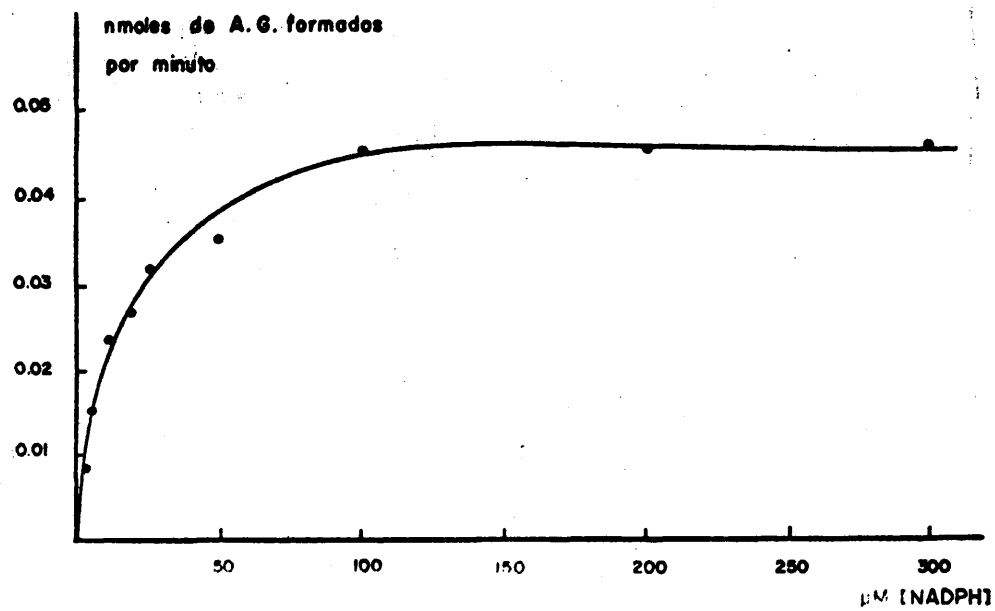


Fig-49

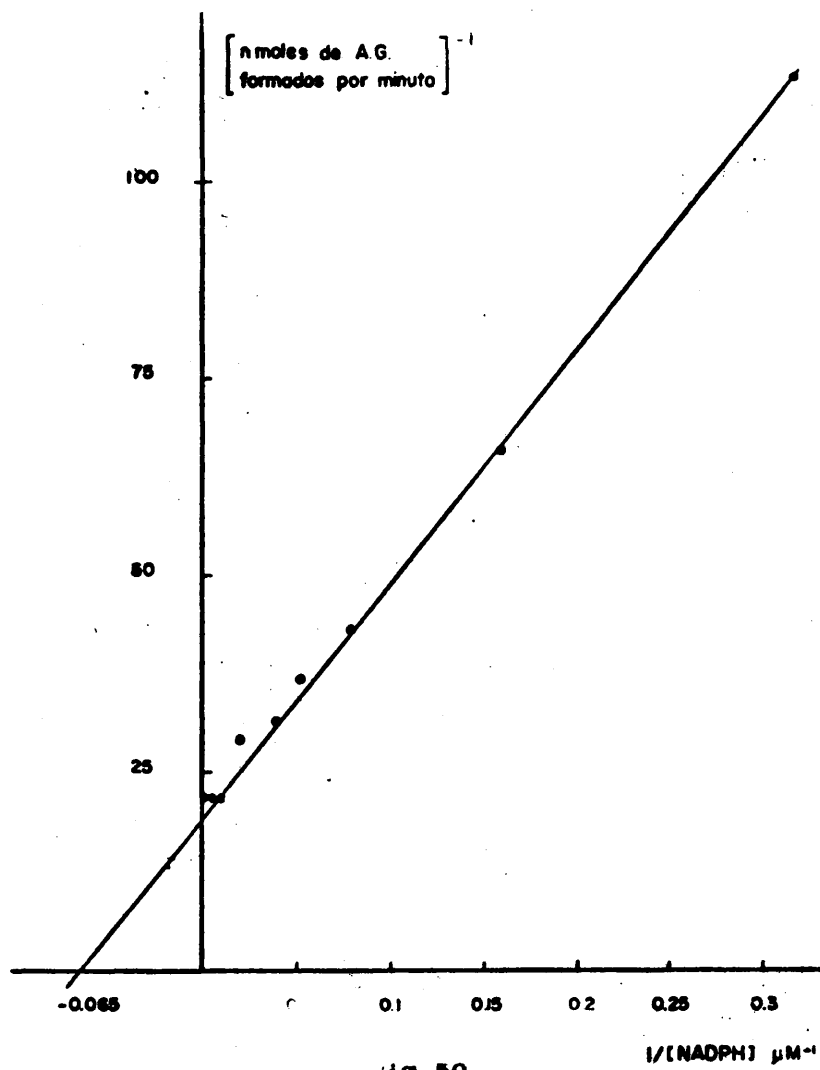


Fig-50

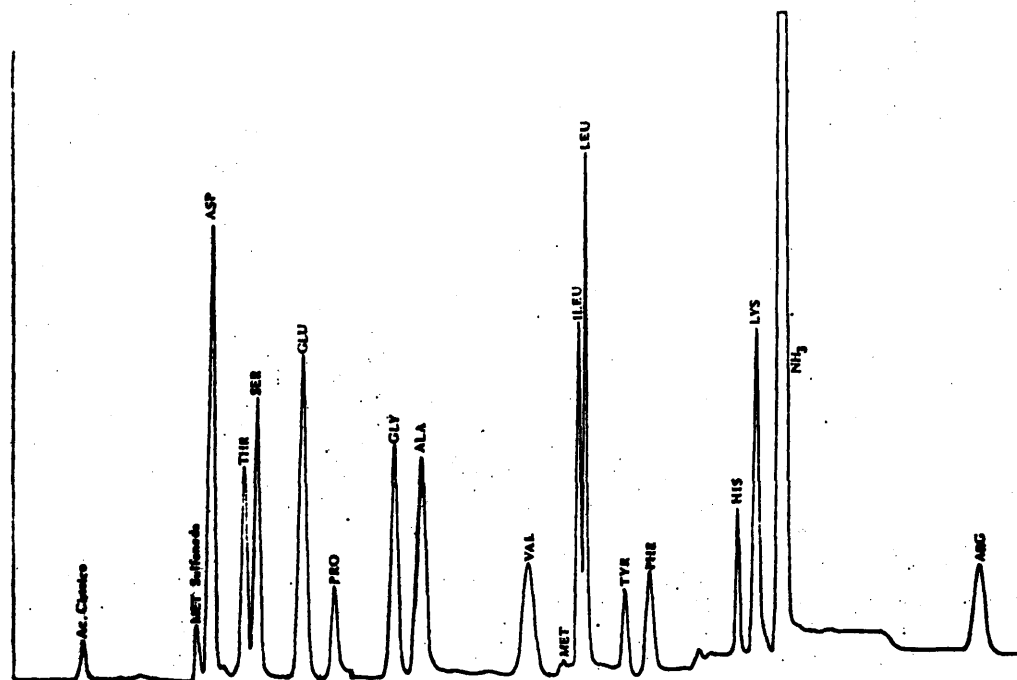


Fig. 51

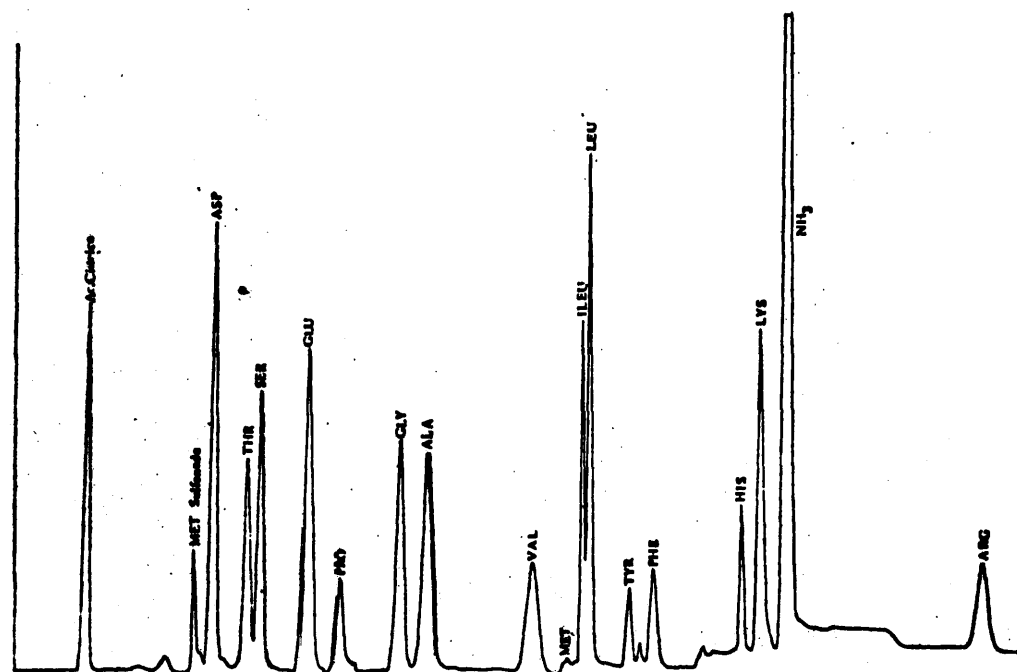


Fig. 52

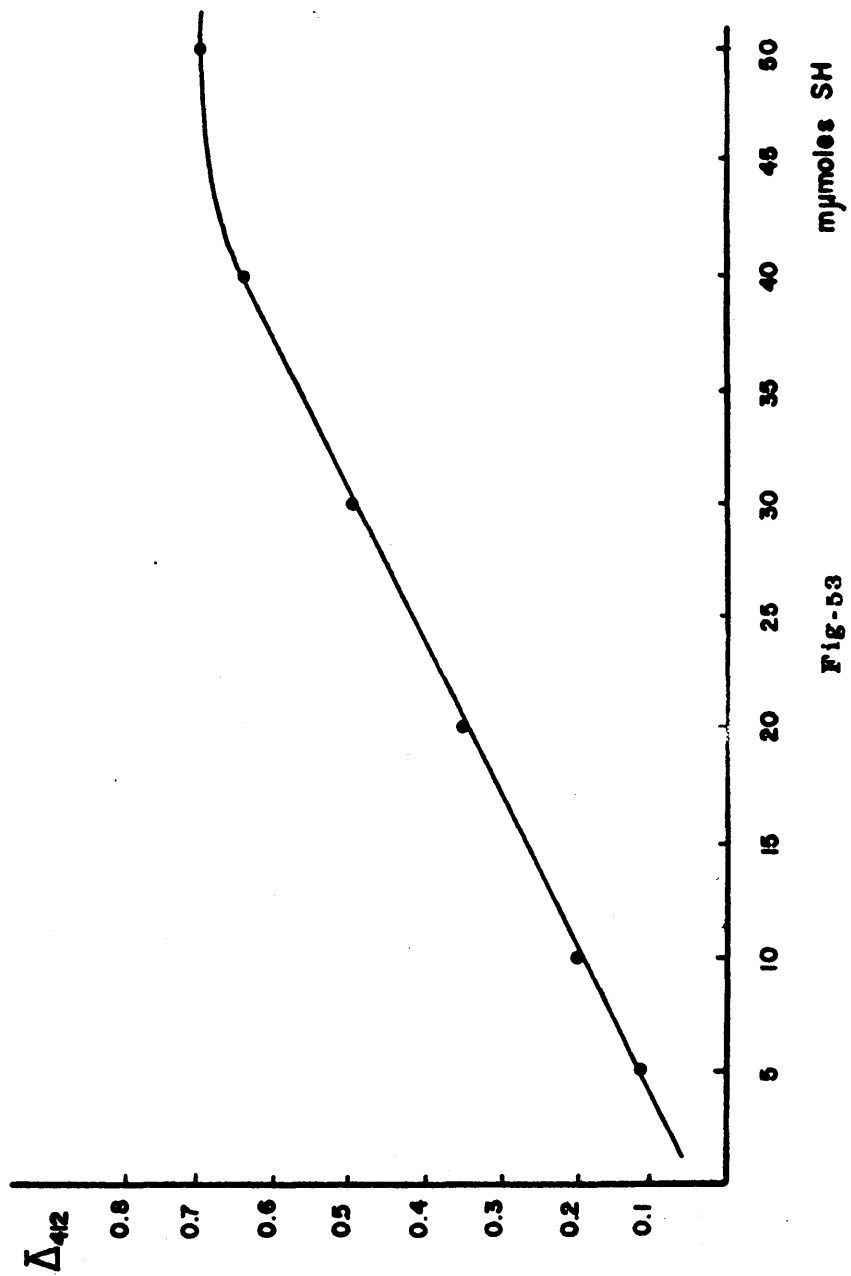


Fig-53

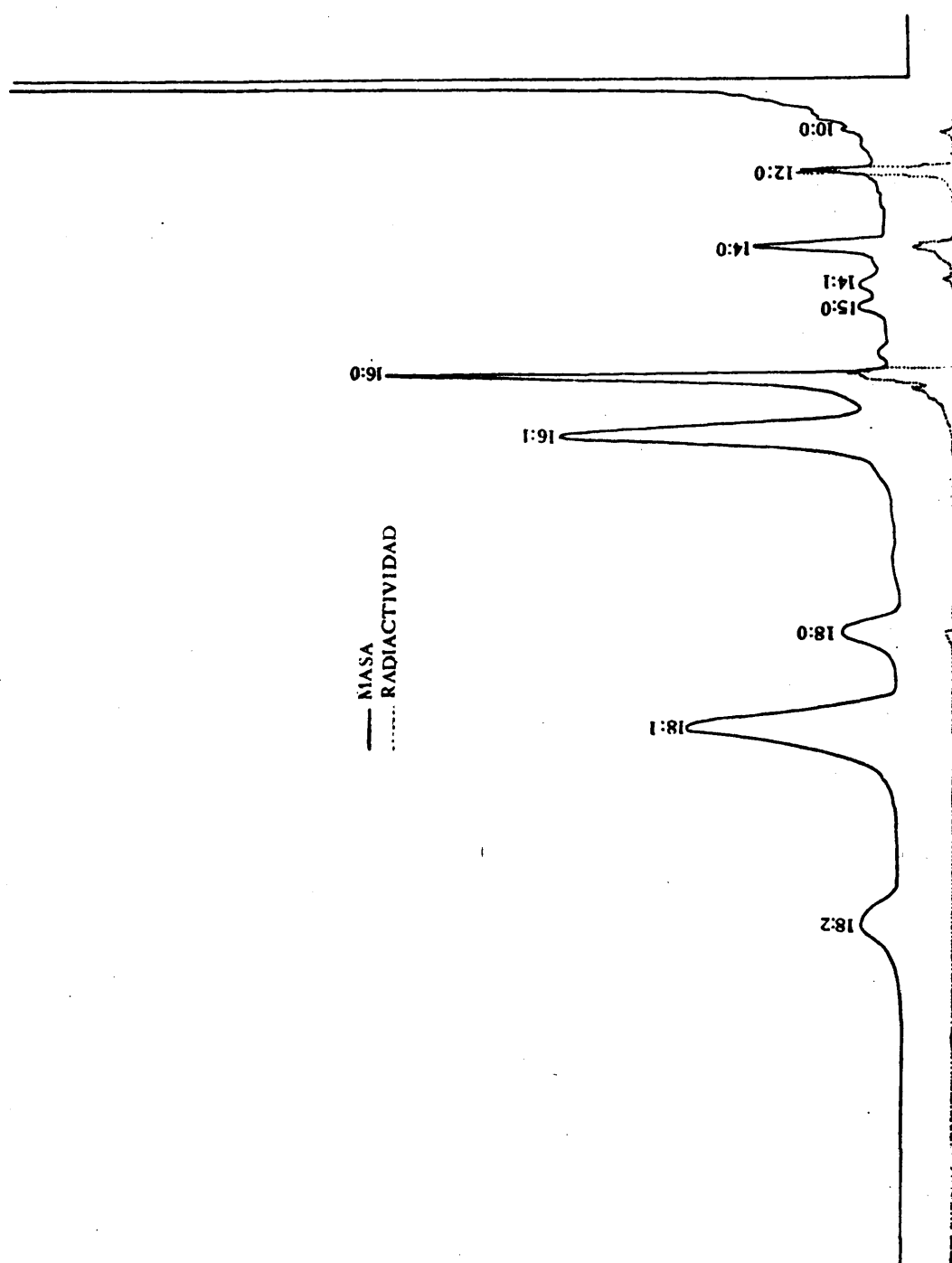


Fig. 54

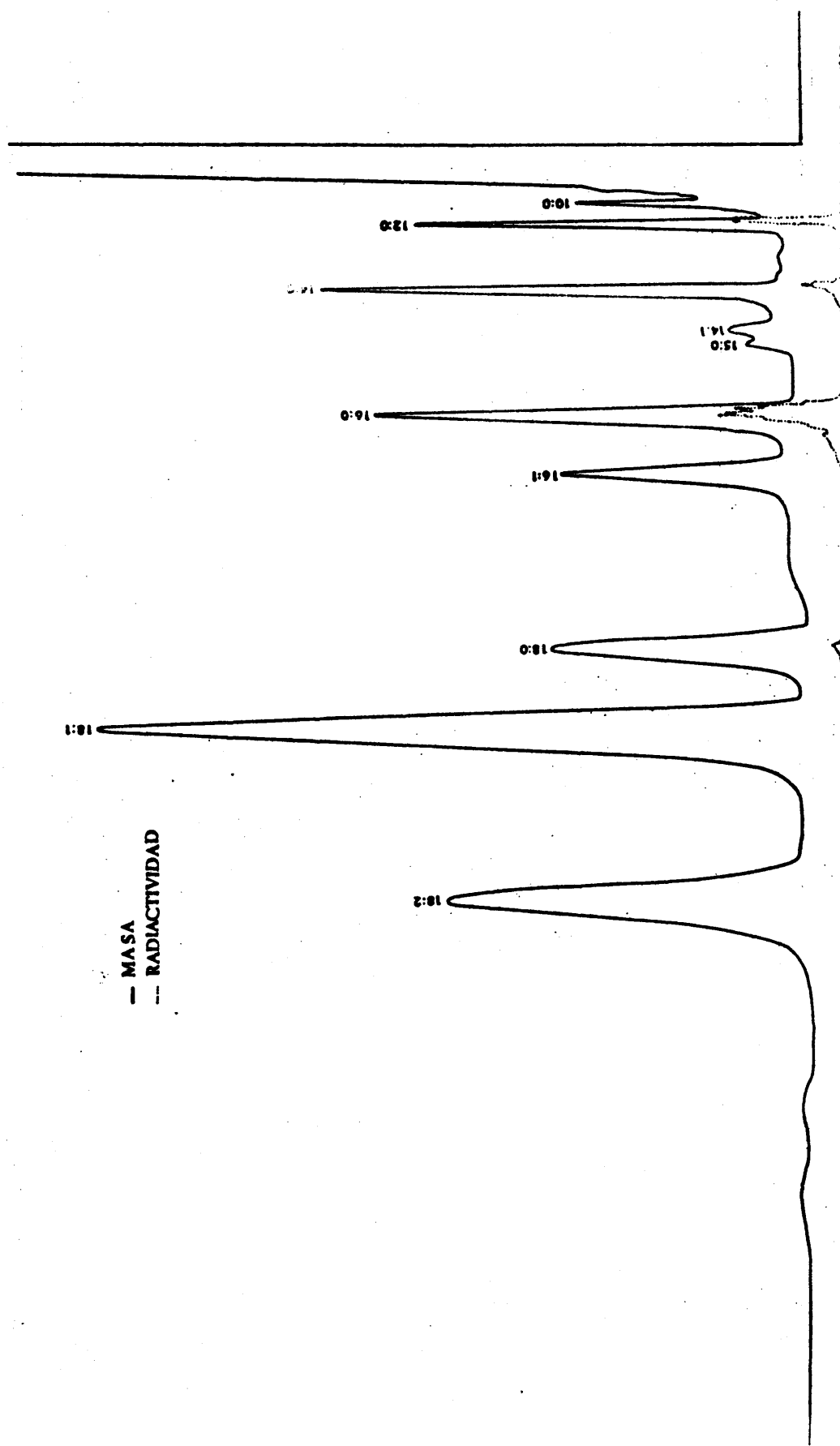


Fig. 55